

N° d'ordre 2231
Série A, N° 1366

THÈSE

PRÉSENTÉE

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

BORIS EPHRUSSI

Licencié ès sciences naturelles

Assistant à l'Institut de Biologie physico-chimique (Paris)

2^e THÈSE. — Croissance et régénération dans les cultures des tissus.

Soutenue le

1932 devant la Commission d'examen

MM. CH. PÉREZ, *Président*

ROBERT-LÉVY }
MARCEL PRENANT } *Examineurs.*

MASSON ET C^{IE}, ÉDITEURS

LIBRAIRES DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE

120, BOULEVARD SAINT-GERMAIN, PARIS (VI^e).

1932

N° d'ordre 2231
Série A, N° 1366

THÈSE

PRÉSENTÉE

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

BORIS EPHRUSSI

Licencié ès sciences naturelles

Assistant à l'Institut de Biologie physico-chimique (Paris)

2^e THÈSE. — Croissance et régénération dans les cultures des tissus.

Soutenue le

1932 devant la Commission d'examen

MM. CH. PÉREZ, *Président*

ROBERT-LÉVY }
MARCEL PRENANT } *Examineurs.*

MASSON ET C^{IE}, ÉDITEURS

LIBRAIRES DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE

120, BOULEVARD SAINT-GERMAIN, PARIS (VI^e)

1932

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

MM.

Doyen C. MAURAIN, *Professeur*, Physique du globe.

Doyen honoraire . . . M. MOLLIARD.

Professeurs honoraires . . . H. LE CHATELIER.

H. LEBESGUE.

A. FERNBACH.

A. LEDUC.

Emile PICARD.

Rémy PERRIER.

E. GOURSAT Analyse supérieure et algèbre supérieure.

P. JANET Electrotechnique générale.

F. WALLERANT Minéralogie.

P. PAINLEVÉ Mécanique analytique et Mécanique céleste.

M. CAULLERY Zoologie (Évolution des êtres organisés).

Emile BOREL Calcul des probabilités et Physique mathém.

H. ABRAHAM Physique.

M. MOLLIARD Physiologie végétale.

E. CARTAN Géométrie supérieure.

Gabriel BERTRAND Chimie biologique.

Jean PERRIN Chimie physique.

L. LAPICQUE Physiologie générale.

M^{me} P. CURIE Physique générale et radioactivité.

G. URBAIN Chimie générale.

L. MARCHIS Aviation.

E. VESSIOT Théorie des fonctions et théorie des transformations.

A. COTTON Physique générale.

J. DRACH Application de l'analyse à la géométrie.

Charles FABRY Physique.

R. LESPIEAU Théories chimiques.

P. PORTIER Physiologie comparée.

Charles PÉREZ Zoologie.

Professeurs E. BLAISE Chimie organique.

P.-A. DANGEARD Botanique.

Léon BERTRAND Géologie structurale et géologie appliquée.

E. RABAUD Biologie expérimentale.

G. JULIA Calcul différentiel et calcul intégral.

Paul MONTEL Mécanique rationnelle.

V. AUGER Chimie appliquée.

P. WINTREBERT Anatomie et histologie comparées.

O. DUBOSQ Biologie maritime.

Eugène BLOCH Physique théorique et physique céleste.

N. Etude des combustibles.

L. LUTAUD Géographie physique et géologie dynamique.

Henri VILLAT Mécanique des fluides et applications.

Ch. JACOB Géologie.

P. PASCAL Chimie minérale.

Léon BRILLOUIN Théories physiques.

E. ESCLANGON Astronomie.

H. BÉNARD Mécanique expérimentale des fluides.

G. MAUGUIN Minéralogie.

L. BLARINGHEM Botanique.

A. GUILLIERMOND Botanique. (P. C. N.)

A. DENJOY Mathématiques générales.

A. DUFOUR Physique. (P. C. N.)

H. BÉGIN Mécanique physique et expérimentale.

E. PÉCHARD Chimie. (Enseig^t P. C. N.)

A. GUILLET Physique.

M. GUICHARD Chimie minérale.

A. MICHEL-LÉVY Pétrographie.

A. DEREIMS Géologie.

H. MOUTON Chimie physique.

L. DUNOYER Optique appliquée.

M. JAVILLIER Chimie biologique.

ROBERT-LÉVY Zoologie.

A. DEBIERNE Radioactivité.

E. DARMOIS Physique.

G. BRUHAT Physique.

F. PICARD Zoologie. (Évolution des

êtres organisés.)

L. JOLEAUD Paléontologie.

M. FRÉCHET Calcul des Probabilités et

Physiques mathématiques.

M^{me} RAMART-LUCAS. Chimie organique.

Foch Mécanique expérimentale des fluides.

PAUTHENIER Physique. (P. C. N.).

VILLEY Mécanique physique et expérimentale.

De BROGLIE Théories physiques.

LABROUSTE Physique du Globe.

FREUNDLER Chimie (P. C. N.).

PRENANT Zoologie.

P. JOB Chimie générale

CHRÉTIEN Optique appliquée.

BOHN Zoologie (P. C. N.).

N. Chimie (P. C. N.).

COMBES Sciences naturelles. (P. C. N.).

GARNIER Mécanique rationnelle.

Secrétaire A. PACAUD.

Secrétaire honoraire D. TOMBECK.



CROISSANCE ET RÉGÉNÉRATION DANS LES CULTURES DES TISSUS

Par Boris EPHRUSSI.

(Institut de Biologie physico-chimique, Paris.)

SOMMAIRE

I. — INTRODUCTION.	1
<i>Méthode.</i>	3
II. — LA CROISSANCE DES CULTURES DE FIBROBLASTES.	5
A. La croissance résiduelle.	7
<i>Technique.</i>	8
<i>Résultats expérimentaux.</i>	*10
B. La croissance des cultures nourries.	21
III. — LA RÉGÉNÉRATION <i>in vitro</i>	28
A. Recherches personnelles.	30
<i>Technique.</i>	31
<i>Résultats expérimentaux.</i>	32
B. Origine de la forme circulaire des cultures.	50
IV. — CONCLUSIONS	61
V. — RÉSUMÉ	64
INDEX BIBLIOGRAPHIQUE.	65

I. — INTRODUCTION

Les fondateurs de la théorie cellulaire ont été amenés à considérer la cellule comme une unité organique et comme un organisme indépendant. Rien d'étonnant à cela lorsqu'on songe quelle profonde influence a dû exercer sur eux la découverte de la nature monocellulaire des Protistes. La conception du Métazoaire en tant que colonie cellulaire en a découlé logiquement.

Plus tard, au contraire, l'étude de la croissance en général et du développement embryonnaire en particulier, a amené certains biologistes à considérer l'organisme d'un Métazoaire comme une entité (*organism as a whole*) dans laquelle un degré bien faible

d'indépendance fut réservé aux éléments cellulaires. Poussant cette conception à l'extrême, certains auteurs sont arrivés à concevoir l'organisme comme un vaste syncytium. Ces deux points de vue se retrouvent encore aujourd'hui.

La possibilité de cultiver *in vitro* des tissus extraits de l'organisme semblait promettre une solution rapide du problème. Aussi plusieurs auteurs, parmi lesquels il faut citer surtout **M. T. Burrows**, **P. Rous**, **A. Fischer**, **O. Olivo**, se sont attachés à l'étude de ce problème en essayant d'obtenir des cultures à partir d'un seul élément. Sans pouvoir se mettre d'accord sur les faits, ils sont bientôt arrivés à des conclusions divergentes.

C'est que la solution du problème, posé avec une apparente clarté, rencontre plus que les seules difficultés de démonstration. Une part au moins aussi importante de difficultés vient de l'imprécision de la notion même de l'individualité : celle-ci, facile à définir dans les cas extrêmes comme celui d'un Infusoire ou d'un animal supérieur, devient de plus en plus délicate sur les degrés intermédiaires de l'échelle de l'évolution : on sait quelles difficultés elle rencontre dans le cas, par exemple, d'une Éponge.

Par ailleurs, montrer qu'une cellule peut se multiplier à l'état isolé reviendrait à montrer que la cellule extraite d'un organisme complexe a gardé ses caractères d'individu. Mais cette démonstration n'apporterait pas la réponse à la question posée qui n'envisage pas les *potentialités* d'une cellule, mais son *devenir réel*.

C'est dire que pour conclure à la nature « syncytiale » ou « coloniale » de l'organisme, la question de savoir si ses éléments constitutifs peuvent survivre ou évoluer à l'état isolé, est *secondaire*, et la seule chose qui importe est de savoir si, à l'intérieur d'un tissu et à l'intérieur de l'organisme, les cellules évoluent réellement indépendamment les unes des autres, ou si, au contraire, elles s'influencent mutuellement.

Lorsque l'on pose la question sous cet aspect, on s'aperçoit que la réponse est depuis longtemps donnée (dans tous les domaines de la biologie on a accumulé une foule de données sur les corrélations entre organes, tissus et cellules) et que l'on peut passer à la deuxième partie du problème, c'est-à-dire qu'on peut déjà examiner la question suivante : dans lesquelles de ses manifestations la cellule

agit-elle comme un organisme indépendant et dans lesquelles son activité est-elle subordonnée à celle de l'ensemble?

Ce problème, différent du premier, trouvera dans la méthode de culture des tissus un instrument d'analyse infiniment précieux.

Il en est de même de la question qui suivra naturellement et immédiatement la précédente : celle de savoir par quelles voies s'exerce telle ou telle influence de la collectivité sur ses éléments constitutifs. Dans cet ordre d'idées les travaux de **A. Fischer** ont déjà apporté des conclusions importantes en montrant que, dans la propagation de certaines impulsions, les relations directes de cellule à cellule jouent un rôle capital, et ont amené leur auteur à considérer une culture de tissu comme un organisme élémentaire.

C'est ce deuxième aspect du problème qui est surtout visé dans le présent travail que nous considérons comme une introduction à l'étude de ce que **A. Carrel** a appelé la Sociologie cellulaire, et c'est dans l'étude de la croissance et de la régénération des cultures des tissus que nous comptons trouver la réponse aux questions plus précises suivantes :

1° Les cellules se comportent-elles dans ces conditions très simples comme des individus indépendants? ou bien

2° Sont-elles soumises déjà à certaines lois de la collectivité? Et dans le cas d'une réponse affirmative à cette deuxième question :

3° De quelle nature sont les influences qui, venant de l'ensemble, s'exercent sur les éléments isolés?

*
* *

Méthode. — La technique que nous avons utilisée dans nos recherches est la technique classique de **Carrel** telle que nous l'avons vu pratiquer d'abord au Laboratoire du prof. G. Levi, à Turin, puis au Laboratoire du Dr **A. Fischer**, au Kaiser-Wilhelm-Institut. Nous admettons que cette technique est connue et ne reviendrons pas sur ses détails que l'on trouvera exposés complètement dans l'ouvrage magistral de **A. Fischer**¹.

1. *Gewebezüchtung*, Müller et Steinicke, éd., Munich, 1930. Voir également : B. Ephrussi, *La Culture des tissus*, Collection des Actualités biologiques, Gauthier-Villars, édit., Paris, 1932.

Toutes les expériences qui seront décrites ont été réalisées sur des cultures pures de fibroblastes, provenant du cœur de l'embryon de Poulet au huitième jour d'incubation.

Nous n'avons employé que des milieux de culture homologues : plasma de Poule obtenu par saignée carotidienne et extrait embryonnaire (embryons de Poulet au huitième jour d'incubation).

Les solutions salines employées sont : la solution de Ringer pour le lavage des cultures, la solution de Tyrode pour la dilution du plasma et de l'extrait embryonnaire.

Pour l'entretien de nos souches nous avons employé la méthode de culture en goutte pendante. La majorité des expériences a été au contraire effectuée dans des flacons Carrel, type D-3.

Les mesures planimétriques des cultures ont été effectuées sur des dessins obtenus par projection des cultures sous un grossissement linéaire de 16 à 25 diamètres (indications dans le texte).

*
* *

Tout le monde connaît actuellement les nombreuses difficultés des techniques auxquelles nous avons eu recours dans ce travail. En fait, ce travail n'a pu être effectué que grâce à des conditions matérielles exceptionnellement favorables que nous avons eues à notre disposition et que nous devons à la fois à la générosité du baron Edmond de Rothschild et à la libéralité de notre maître, M. le Pr E. Fauré-Fremiet, et des directeurs de notre Institut, MM. P. Girard, A. Mayer, J. Perrin et G. Urbain. Qu'ils veuillent tous trouver ici l'expression de notre profonde et sincère reconnaissance.

Nous tenons également à remercier nos amis F. Perrin, M. Prenant, G. Teissier et R. Wurmser des multiples suggestions dont nous avons si largement profité.

Enfin, nous remercions Mme J. Feron et Mlle O. Baur de l'aide toujours joyeuse qu'elles nous ont apportée dans notre travail.

II. — LA CROISSANCE DES CULTURES DE FIBROBLASTES

Avant d'aborder l'étude de la croissance des ensembles cellulaires constituant les cultures de fibroblastes, nous devons nous arrêter un instant sur la multiplication des cellules considérées isolément.

La première question qui se pose est de savoir si les éléments cellulaires sont équivalents au point de vue de la fréquence de division.

Olivo et De Lorenzi (1928) ont cherché à répondre à cette question en déterminant la durée de l'intercinèse des différentes cellules d'une manière directe. Dans une série d'expériences ces auteurs ont poursuivi un certain nombre de cellules à partir d'une première division pour déterminer le moment où ces cellules rentreraient de nouveau en division. De cette manière **Olivo et De Lorenzi** ont pu montrer que la durée de l'intercinèse peut varier, d'une cellule à l'autre, dans des larges limites (de sept à vingt et une heures). La conclusion qui se dégage immédiatement de ces faits est que la population cellulaire constituant une culture est hétérogène quand à la fréquence de multiplication de ses éléments.

Une deuxième question est de savoir si, dans l'ensemble de la colonie, les divisions cellulaires sont réparties d'une manière régulière dans le temps et dans l'espace.

Albert Fischer (1925) a essayé de répondre à la première de ces questions en photographiant la périphérie d'une culture toutes les dix minutes et en dénombrant ensuite les mitoses sur les photographies. Il a observé que des moments où l'on rencontre des divisions cellulaires assez nombreuses sont suivis de périodes où l'on n'en trouve pas; **Fischer** en conclut à l'existence de rythmes qui seraient l'expression d'une excitation qui viendrait périodiquement de l'ensemble de la culture et ceci constitue pour **Fischer** un premier argument en faveur de la conception qui considère une culture de tissus comme une unité biologique.

Cependant les observations de **Fischer** portent sur un nombre très petit de cellules; c'est pourquoi **Olivo** (1928) a repris les mêmes recherches par une méthode un peu différente : il choisit un champ

comportant 40 à 70 cellules et note les moments des divisions cellulaires successives. **Olivo** aboutit à la conclusion que les mitoses sont réparties dans le temps sans aucune régularité, c'est-à-dire absolument au hasard. Il faut remarquer cependant que si l'on calcule, à partir des chiffres de **Olivo**, le nombre de mitoses qui se sont produites pendant des périodes successives, de trente-cinq minutes par exemple (c'est, d'après **Olivo**, la durée de la mitose à 39°) on trouve également que le nombre de mitoses varie considérablement d'une période à l'autre. Une conclusion définitive semble donc difficile à tirer des documents que nous possédons à l'heure actuelle.

Pour ce qui est de la répartition des mitoses dans l'espace, nous possédons, au contraire, des données assez précises. Déjà **G. Levi** (1923) a noté que la grande partie des mitoses se produisent à la périphérie des cultures. Plus récemment, **A. Fischer et R. Parker** (1929) ont fait des statistiques exactes du nombre des mitoses dans les différentes régions d'une même culture. Ils ont coupé des cultures et ont décomposé les coupes en un certain nombre de carrés de surface égale. Ils ont calculé ensuite le pourcentage des mitoses dans la région centrale et dans la zone marginale d'une culture (ce que les auteurs entendent par zone marginale correspond à 10 p. 100 environ de la surface de la culture). Dans ces conditions ils ont trouvé que l'index mitotique dans la périphérie de la culture est presque 10 fois plus élevé que dans le centre de la même culture. Ces faits montrent que la place qu'une cellule occupe dans un ensemble crée une différence en ce qui concerne la fréquence de ses divisions et constitue un nouvel élément d'hétérogénéité de la population cellulaire.

Ceci étant dit, nous pouvons aborder maintenant l'étude de la croissance de la culture, en tant qu'ensemble.

*
* * *

Depuis longtemps **Carrel** (1923) insiste sur la nécessité de distinguer très nettement la véritable culture des tissus, caractérisée par l'augmentation continue de la masse du tissu et réalisée uniquement en présence d'un aliment complet (extrait embryonnaire),

de la simple survie des tissus, phénomène de plus ou moins courte durée. La survie des tissus *in vitro*, trouvant son expression dans l'émigration et, le plus souvent, dans la multiplication temporaire des éléments cellulaires, se produit, contrairement à la véritable culture des tissus, dans n'importe quel milieu protecteur, c'est-à-dire dans tout milieu respectant les équilibres cellulaires (pH, équilibre des ions, etc.).

Dans les pages qui suivent nous allons envisager successivement les deux cas en commençant par le plus simple : celui de la croissance résiduelle.

A. — LA CROISSANCE RÉSIDUELLE.

L'activité (mouvement et multiplication cellulaires) qu'un fragment de tissu manifeste dans un milieu purement protecteur a été désignée par **Carrel** (1923) sous le nom d'activité ou d'énergie résiduelle des tissus. Selon **Carrel** l'activité résiduelle des tissus a pour source la petite quantité de substances de réserve que tout fragment de tissu prélevé sur l'organisme, ou toute culture précédemment entretenue dans un milieu nutritif, apporte avec elle. **Carrel** (1923) a d'ailleurs montré expérimentalement que la croissance effectuée par une culture dans un milieu non nutritif dépend des conditions nutritives dans lesquelles cette culture a été placée antérieurement. Si l'on cultive dans un milieu purement protecteur les deux moitiés d'une même culture, placées pendant les quarante-huit heures précédant l'expérience, l'une dans un extrait embryonnaire à 5 p. 100, l'autre dans un extrait à 50 p. 100, on constate que les tailles maxima qu'elles atteignent sont inégales, la première restant toujours plus petite que la seconde. Cela signifie évidemment que les cultures vivent, pour une large part tout au moins, sur les réserves qu'elles ont accumulées pendant leur séjour dans le milieu nutritif. Il semble donc que l'accroissement temporaire, qui caractérise l'activité résiduelle d'une culture, exige, en dehors des substances qui peuvent se trouver dans le plasma, certains éléments plus particuliers, que renferment l'extrait embryonnaire et les réserves intracellulaires, mais qui manquent dans le plasma. Mais, pour probable que semble cette conclusion, elle ne

peut être rigoureusement établie par des expériences du genre de celles qui viennent d'être rappelées. Notre première préoccupation était de fournir une preuve quantitative à l'hypothèse de la vie aux dépens des réserves intracellulaires en vérifiant expérimentalement une conséquence qu'elle implique et qui peut être formulée de la manière suivante : si la croissance résiduelle exige la consommation de certaines réserves intracellulaires, les tailles finales des colonies cellulaires doivent être proportionnelles aux tailles initiales des fragments ensemencés.

Technique. — La mesure de l'activité résiduelle des tissus se fait, comme l'avait indiqué **Carrel** (1923), en présence d'une solution physiologique saline, après lavage de la phase solide, plasma coagulé, destiné à éliminer aussi complètement que possible les traces d'extrait embryonnaire qu'on est obligé d'y ajouter pour assurer une bonne coagulation du plasma. La solution de Tyrode dont on se sert dans la technique classique de la culture des tissus est cependant loin d'être une solution physiologique parfaite : son pH par exemple subit des variations assez sérieuses. C'est sans doute pour ces raisons que **Carrel** remplace¹, depuis la découverte de l'héparine, la solution de Tyrode par le plasma hépariné. Les tissus se trouvent ainsi baignés par un liquide dont la composition est sans doute très proche de celle de la lymphe interstitielle, milieu naturel des tissus *in vivo*. Dans une partie des expériences qui font l'objet du présent travail nous nous sommes servis également de plasma hépariné en tant que phase liquide, et ce fait nous amène à répondre dès maintenant à une objection possible.

Il a été admis à la suite des expériences de **Carrel et Ebeling** (1921-1923) que le plasma et le sérum sont pratiquement dépourvus des substances nécessaires à la multiplication indéfinie des fibroblastes. Ce fait justifie, semble-t-il, l'emploi du plasma en tant que milieu protecteur beaucoup plus complet que les solutions salines dans les expériences de mesure de l'énergie résiduelle. Cependant **Fischer et Parker** (1929) ont récemment introduit une nouvelle technique de culture de tissus, dite de vie ralentie, qui consiste précisément à entretenir les tissus en présence de plasma et en l'absence

1. Cité d'après **Fischer**, Gewebezüchtung, 1930.

d'extrait embryonnaire, technique qui s'est montrée extrêmement féconde dans l'étude de plusieurs problèmes et qui semble indiquer que le plasma contient tout au moins les substances nécessaires à l'entretien des tissus. On semble ainsi être amené à faire une distinction entre les substances nutritives proprement dites, et les substances stimulantes, provoquant la multiplication cellulaire intense caractéristique de la culture des tissus dans sa technique classique (emploi de l'extrait embryonnaire)¹.

Depuis deux ans la technique de vie ralentie a été constamment pratiquée dans notre laboratoire. Notre expérience personnelle nous amène à des résultats tout à fait semblables à ceux obtenus par **Fischer et Parker**. Les nombreuses courbes que nous avons tracées nous permettent de distinguer deux types de croissance en présence de plasma. Dans le premier cas, la courbe (surface en fonction du temps) est nettement une courbe résiduelle, c'est-à-dire une courbe en S. Le plus souvent la croissance des deux moitiés d'une même culture est parfaitement identique lorsque l'une est recouverte de plasma, l'autre de Tyrode. La seule différence réside dans le fait que les cultures en Tyrode se désagrègent très rapidement après l'arrêt de la croissance, tandis que les cultures en plasma gardent leur aspect normal après cet arrêt.

Dans d'autres cas le début de la croissance reproduit encore une courbe résiduelle; cependant le plateau n'est atteint que très lentement (quelquefois au bout de trois à quatre semaines au lieu de huit à dix jours). D'autre part, chaque renouvellement du plasma baignant la culture est marqué par une légère activation de la prolifération de la colonie, ce qui donne l'impression que la culture puise tout de même quelque chose dans le plasma. Il est possible que cette différence entre les deux types de courbes de croissance correspond à des valeurs inégales des plasmas utilisés.

Dans ce chapitre nous n'envisageons, bien entendu, que les courbes du premier type, c'est-à-dire les courbes nettement résiduelles. Toutes nos expériences ont été effectuées sur des cultures pures de fibroblastes,ensemencées dans des flacons Carrel D-3. Deux

1. Ce point de vue semble trouver sa confirmation dans le mémoire de Z. Zakrzewski (1932) dont nous avons pris connaissance au moment de la correction des épreuves (Z. Zakrzewski, *Arch. f. Exp. Zellforsch.*, t. XIII, p. 152).

cultures de taille inégale furent toujours cultivées l'une à côté de l'autre, dans un même récipient. La phase solide du milieu était constituée par un mélange de 0 cm³ 5 de plasma et de 1 cm³ de Tyrode, coagulé par une goutte d'extrait embryonnaire. Pour assurer une bonne disposition des deux fragments et surtout, ce qui est particulièrement important, pour éviter toute contraction des fragments ensemencés, nous nous sommes servis d'un artifice récemment introduit par **Fischer**, le collage préalable des cultures au fond du flacon à l'aide d'une petite goutte de plasma.

Dans quelques-unes de nos expériences, la technique de **Fischer et Parker** (vie ralentie) était employée. Dans d'autres, la phase liquide surnageant le coagulum d'une manière permanente était constituée soit par 0,5-1 cm³ de plasma hépariné à 5 p. 100, soit par 1 centimètre cube de Tyrode. Dans les deux cas les lavages et, dans le second, les renouvellements de la phase liquide étaient effectués tous les deux à trois jours.

Un choix particulièrement sévère des cultures est nécessaire pour la réussite des expériences dont il s'agit ici. Nous n'avons utilisé que des cultures d'une épaisseur parfaitement homogène et ne présentant aucune nécrose centrale. Les deux fragments de taille inégale ont toujours été découpés dans une même culture et de telle sorte que leur forme ne soit pas trop différente. Les mesures planimétriques étaient effectuées sur des dessins obtenus par projection avec un grossissement linéaire de 19 fois.

Résultats expérimentaux. — Conformément à ce qui a été dit plus haut nos expériences consistaient à mesurer l'accroissement de deux fragments de taille inégale de la même culture, proliférant côte à côte dans le même récipient. Le tableau I donne les chiffres relatifs à neuf de ces expériences et les figures 1 et 2 représentent l'accroissement de la surface de deux couples de cultures. A côté des chiffres indiquant la surface de chaque culture mesurée toutes les vingt-quatre heures est indiqué le rapport des surfaces des grandes cultures sur celles des petites d'une même paire $\left(\frac{a}{b}\right)$. L'évolution de ce rapport est en outre représentée par les deux courbes inférieures des figures 1 et 2.

TABLEAU I.

JOURS	N° 11651 <i>a-b</i>			N° 12297 <i>a-b</i>			N° 11133-34		
	<i>a</i>	<i>b</i>	$\frac{a}{b}$	<i>a</i>	<i>b</i>	$\frac{a}{b}$	<i>a</i>	<i>b</i>	$\frac{a}{b}$
0	4,3	2,3	1,87	5,6	2,9	1,93	2,4	2,0	1,2
1	12,7	7,7	1,65	15,4	9,1	1,69	11,3	10,3	1,1
2	19,5	13,2	1,48	27,2	19,8	1,37			
3	26,2	15,9	1,65	32,3	24,1	1,34	16,2	13,8	1,17
4				38,7	24,5	1,58			
5	33,5	20,2	1,66	45,5	30,1	1,47	18,8	14,9	1,26
6	35,0	20,7	1,69	50,4	33,0	1,52			
7	36,9	23,3	1,59	60,1	35,0	1,74	19,1	15,0	1,27
8	38,4	23,5	1,63	65,3	37,5	1,74			
9	43,3	23,0	1,86	69,7	38,7	1,80	19,3	14,7	1,31
10	42,4			75,7	38,0	1,99			
11	43,3								
12				77,8	38,3	2,01			
13				77,8	38,3	2,01			

JOURS	N° 12346 <i>a-b</i>			N° 12348 <i>a-b</i>			N° 1468 <i>a-b</i>		
	<i>a</i>	<i>b</i>	$\frac{a}{b}$	<i>a</i>	<i>b</i>	$\frac{a}{b}$	<i>a</i>	<i>b</i>	$\frac{a}{b}$
0	6,4	2,0	3,2	8,4	2,1	4,0	4,4	2,0	2,20
1	16,8	9,7	1,73	21,2	15,2	1,39	18,7	11,0	1,70
2	25,0	14,6	1,71	31,1	23,5	1,33			
3	34,2	15,8	2,16	40,2	29,7	1,35	21,7	11,4	1,90
4	42,0	17,4	2,41	53,2	33,3	1,60	25,0	12,8	1,95
5	48,8	17,9	2,73	65,0	36,1	1,81	25,2	12,7	1,98
6	53,1	17,6	3,01	73,2	38,0	1,93	27,3	12,5	2,18
7			(+)			(+)	27,2	12,5	2,17
8									

JOURS	N° 13396 <i>a-b</i>			N° 13393 <i>a-b</i>			N° 13392 <i>a-b</i>		
	<i>a</i>	<i>b</i>	$\frac{a}{b}$	<i>a</i>	<i>b</i>	$\frac{a}{b}$	<i>a</i>	<i>b</i>	$\frac{a}{b}$
0	3,24	1,83	1,77	2,9	1,85	1,57	2,9	1,33	2,18
1	15,8	9,2	1,72	19,4	16,0	1,20	14,8	11,4	1,30
2	21,9	14,4	1,52	33,6	28,9	1,16	24,6	14,1	1,74
3	25,9	15,8	1,64	43,5	33,2	1,31	28,2	14,9	1,89
4	28,9	17,8	1,62	48,5	33,4	1,45	30,6	15,4	1,89
5	31,6	17,8	1,77	56,6	37,5	1,51	31,4	15,9	1,98
6	31,6	17,8	1,77	59,2	37,5	1,58	32,7	15,9	2,06
7	31,6	17,8	1,77	59,2	37,5	1,58	33,8	15,9	2,12
8							33,8	15,9	2,12

(+) Expérience interrompue.

Il ressort de l'ensemble de ces données que :

a) Les tailles finales des colonies sont proportionnelles aux tailles des fragmentsensemencés.

b) Le rapport des surfaces des deux cultures commence par diminuer rapidement, pour remonter ensuite plus lentement jusqu'à

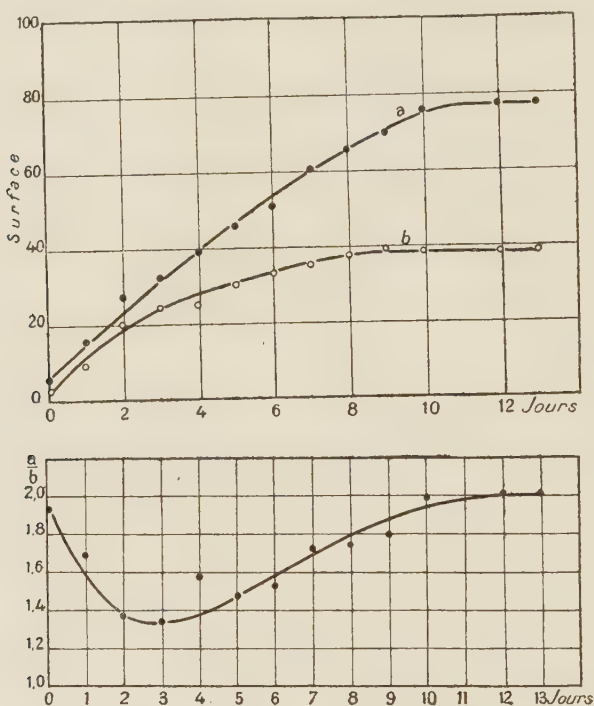


FIG. 1. — Croissance résiduelle des cultures sœurs 12297 A et B et variations du rapport des surfaces des deux cultures.

la valeur initiale; ceci revient à dire que l'accroissement des petites cultures est plus rapide que celui des grandes; les petites cultures parviennent donc les premières à la taille finale.

Ces deux constatations nous permettront de tirer plusieurs conclusions :

1. Le fait que la croissance des petites cultures s'arrête avant celle des grandes, proliférant à proximité dans le même flacon, prouve que l'arrêt de croissance, dans les conditions de la croissance résiduelle, n'est pas dû à l'accumulation des substances de déchet; le même fait ressort également des expériences encore plus directes

de **Fischer** (1930) que nous avons reproduites à plusieurs reprises et qui consistent à planter des fragments de tissu dans le voisinage immédiat d'une culture dont la croissance est depuis longtemps arrêtée : la prolifération des cultures implantées a néanmoins lieu.

On pourrait incriminer encore, pour expliquer l'arrêt rapide de la croissance, l'accumulation de produits non diffusibles; on pourrait s'attendre en effet à un phénomène de ce genre dans un milieu aussi complexe que le plasma coagulé. Pour parer à cet argument nous

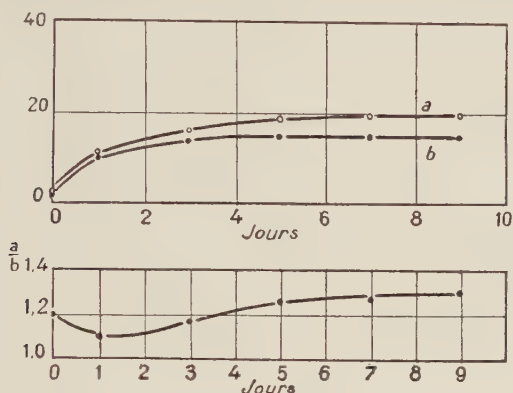


FIG. 2. — Croissance résiduelle des cultures sœurs 11133 A et B et variations du rapport des surfaces des deux cultures.

avons ajouté de l'extrait embryonnaire à une série de cultures dont la croissance résiduelle était complètement terminée et nous avons toujours constaté une reprise de la prolifération (fig. 3). L'ensemble de ces faits nous semble prouver indiscutablement que le rôle de l'accumulation des substances de déchet dans l'arrêt de la croissance résiduelle est négligeable.

2. Le second fait, c'est-à-dire la proportionnalité des tailles initiales et finales de nos cultures, indique que dans les deux cas, — dans le cas des petites cultures aussi bien que dans celui des grandes, — les cellules ont pu se diviser un nombre égal de fois, c'est-à-dire que leur multiplication est strictement liée à l'utilisation de quelques substances dont la quantité est proportionnelle au nombre initial des cellules, ce qui revient à dire qu'il s'agit de substances contenues dans les cellules mêmes¹.

1. Dans un travail antérieur (1931) nous avons essayé d'identifier les substances

3. Dès lors, il ne reste plus qu'à interpréter la différence de forme des courbes de croissance des petites et des grandes cultures, plus précisément leur différence d'étirement suivant l'axe des temps. Ce fait doit, sans aucun doute, être mis en relation avec la constatation de **Fischer et Parker** (1929), à savoir que la multiplication cellulaire est localisée dans une zone périphérique assez étroite des

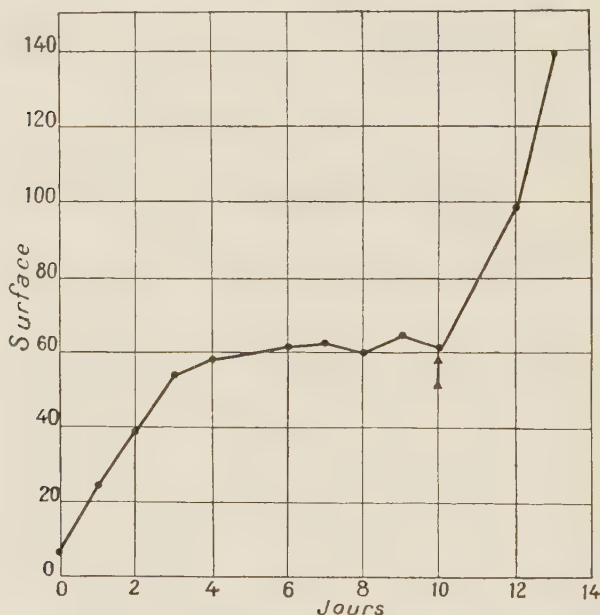


Fig. 3. — Réactivation de la croissance de la culture 12463 A par addition d'extrait embryonnaire. Le moment de l'addition d'extrait embryonnaire est marqué par une flèche.

cultures : dans une petite culture la proportion des cellules en division serait donc à chaque instant plus forte que dans une grande.

4. Enfin, l'expérience avec la culture de deux fragments de taille inégale, permet encore une autre conclusion. Nous avons vu que les tailles finales des colonies sont proportionnelles aux surfaces initiales et non pas aux périmètres initiaux. Nous avons vu, d'autre part, que la croissance résiduelle se produit aux dépens des réserves intracellulaires. Cela veut dire que les cellules périphériques, qui seules prennent part à la prolifération active, usent non seulement

en question. Nous ne revenons pas ici sur cette question, les résultats de ces expériences s'étant montré par la suite moins généraux que nous ne le croyions.

les réserves qu'elles contiennent, mais encore les réserves contenues dans les cellules des régions centrales qui ne se multiplient pas ou qui ne se multiplient que très lentement. Il faut donc admettre le passage de ces substances de réserve des cellules centrales de la culture aux cellules périphériques, qui les utilisent dans leur multiplication.

Cette migration s'interprète très simplement, si l'on admet l'existence de communications directes de cellule à cellule, hypothèse qui, discutée encore par plusieurs histologistes¹ paraît cependant s'imposer dans certaines expériences de **Fischer** (1925) qui ont conduit leur auteur à formuler la théorie des « desmones » déjà mentionnée (p. 3). Nous rappellerons ici que, d'après **Fischer**, une des fonctions des principes cellulaires de la croissance ou desmones serait d'assurer l'unité physiologique d'une culture et nous constaterons que les conclusions que nous venons de tirer de l'étude de la croissance résiduelle apportent un nouvel argument en faveur de cette unité fonctionnelle des cultures de fibroblastes dont nous aurons encore plusieurs preuves au cours de ce travail.

Nous avons vu dans les pages précédentes que la forme particulière des courbes de croissance résiduelle semble être déterminée surtout par deux facteurs : l'épuisement graduel des réserves intra-cellulaires et la localisation périphérique des mitoses. Tenant compte de ces faits, nous avons essayé, en collaboration avec **M. G. Teissier**, de donner une représentation mathématique de ces courbes.

Si toutes les mitoses étaient strictement localisées à la périphérie de la culture dans une bande de largeur constante et faible par rapport au diamètre total, le nombre n des cellules susceptibles de se diviser à un instant donné serait proportionnel à la longueur du contour de la culture. Si cette dernière restait parfaitement circulaire au cours de la croissance, ce nombre serait exactement proportionnel à la racine carrée de la surface s de la culture. Ces deux hypothèses sont assez proches de la réalité pour que l'on puisse écrire

$$(1) \quad n = \lambda \sqrt{s}$$

λ étant un paramètre qui dépend de la culture considérée.

1. Admise par une série d'auteurs (**Cohn**, **Garten**, **Heidenhein**, **Kolossow**, **Laser**), elle est niée par d'autres (**Lewis**, **Garis**, **Kredel**).

Nous compléterons cette hypothèse en admettant que la croissance de la culture ne dépend que de la multiplication cellulaire¹ et que le ralentissement et l'arrêt de celle-ci sont uniquement causés par l'épuisement des réserves intracellulaires. Nous pouvons alors donner une expression numérique du facteur limitant la croissance.

Imaginons que nous prélevions sur une culture nourrie un fragment de surface s_0 . Ce fragment renfermera une quantité de réserves αs_0 proportionnelle à sa surface, le coefficient α dépendant de la souche cellulaire employée et de ses conditions nutritives antérieures. Ce fragment, ensemencé dans un milieu protecteur, s'accroîtra et, au bout du temps t , atteindra une surface s . Cette croissance sera accompagnée d'une consommation des réserves qui sera proportionnelle à l'accroissement de surface $s - s_0$. La quantité de réserves e qui au temps t resteront disponibles sera égale à

$$(2) \quad e = \alpha s_0 - \beta (s - s_0) = (\alpha + \beta) s_0 - s$$

ou α mesure la quantité de réserves contenue à l'origine dans l'unité de surface, et β la quantité de réserves consommées par unité de surface de culture formée.

La formule (2) donne l'expression du facteur limitant de la croissance et nous permettra maintenant d'écrire une loi de croissance applicable aux cultures entretenues dans un milieu protecteur. Nous supposerons que les deux facteurs envisagés agissent indépendamment l'un de l'autre sur l'intensité de la croissance et nous écrirons que cette intensité est proportionnelle à la fois au nombre des cellules susceptibles de se diviser à l'instant considéré, et à la quantité de réserves disponibles au même instant, soit :

$$(3) \quad \frac{ds}{dt} = K \sqrt{s} [(\alpha + \beta) s_0 - \beta s]$$

K étant une grandeur qui dépend de la nature des cellules cultivées, de celle du milieu de culture et des nombreux facteurs de la croissance que nous n'avons pas explicités, et qui peut, à ce titre, être considérée comme fonction de s . Mais comme nous devons admettre

1. On sait cependant que, dans la réalité, l'accroissement d'une culture dépend, pour une part, de l'émigration centrifuge des cellules. Mais il s'agit là d'un facteur qu'il est encore impossible de chiffrer et que nous ne pouvons, par conséquent, expliciter dans nos formules. Nous nous contenterons donc de raisonner ici sur la multiplication cellulaire qui suffit, comme on le verra, à rendre compte des faits observés.

que les deux facteurs que nous avons examinés en détail ont un rôle de beaucoup prédominant et que, par ailleurs, nous ne savons rien sur les possibilités de variation de K , nous supposons que cette grandeur reste constante au cours d'une expérience donnée et que K , au même titre que α et β , est un paramètre caractérisant la culture étudiée.

Après intégration cette équation s'écrit :

$$(4) \quad \log A \frac{1 + \sqrt{\frac{s}{S}}}{1 - \sqrt{\frac{s}{S}}} = \mu \frac{t}{\sqrt{s}}$$

ou

$$(4 \text{ bis}) \quad s = \left[\frac{e^{\frac{\mu t}{\sqrt{s}}} - A}{e^{\frac{\mu t}{\sqrt{s}}} + A} \right]^2 S$$

en posant pour simplifier l'écriture :

$$S = \frac{\alpha + \beta}{\beta} s_0 \quad \mu = K\beta S \quad A = \frac{1 - \sqrt{\frac{s_0}{S}}}{1 + \sqrt{\frac{s_0}{S}}}$$

Il est facile de démontrer que, pour deux cultures sœurs, α, β, A et μ sont indépendants de la taille initiale et qu'au contraire S est proportionnel à s_0^1 .

Nous possédons maintenant tous les éléments nécessaires à la résolution du problème que nous nous étions posé en essayant de traduire analytiquement les résultats expérimentaux.

La courbe de la figure 4 a bien l'allure des courbes expérimentales que nous avons rencontrées au début de ce chapitre. Au temps origine s est égal à s_0 ; lorsque t croît indéfiniment s tend vers une valeur asymptotique S . La plus grande partie de la courbe a sa concavité tournée vers l'axe des t et ce n'est qu'à son début qu'elle présente une concavité tournée vers l'axe des s . Le point d'inflexion qui sépare les deux parties de la courbe se place au moment où se trouve atteint le tiers de la surface limite. Sur la figure 4 qui représente la courbe (s, t) , se trouve également figurée en trait

1. On trouvera les détails de ces calculs dans notre mémoire publié en collaboration avec G. Teissier.

interrompu la courbe $(\sqrt{s}, t)$ dont la concavité est constamment tournée vers l'axe des t .

La figure 5 donne les courbes de croissance théoriques pour deux

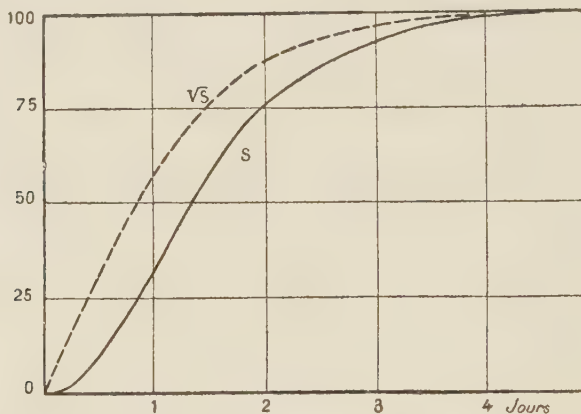


FIG. 4. — Courbe théorique de la croissance résiduelle d'une culture.
Croissance de la surface (s) et croissance du diamètre ($\sqrt{s}$).

cultures dont les surfaces initiales s_{01} et s_{02} seraient entre elles comme 2 est à 1, et qui, en l'absence d'extrait embryonnaire,

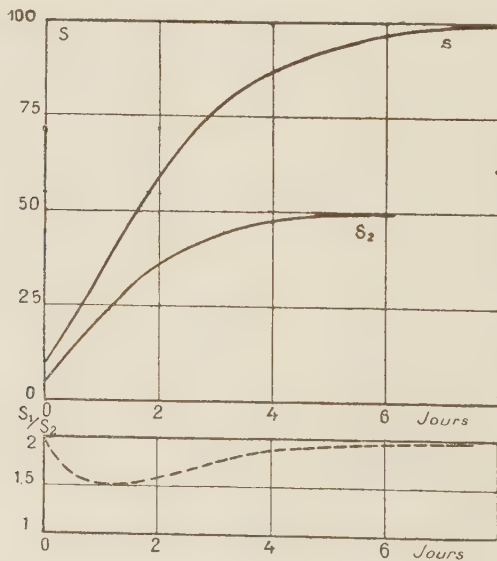


FIG. 5. — Courbes théoriques donnant la marche de la croissance de deux cultures sœurs, de surface initiale 5 et 10, capables de décupler de surface dans leur croissance résiduelle. Variation du rapport des surfaces.

décuplèrent de surface. On notera l'analogie de ces courbes avec celles de la figure 1 et plus encore avec celles de la figure 2. La courbe en ponctué représente les variations du rapport $\frac{s^1}{s_2}$ et est tout à fait semblable à la courbe correspondante de la figure 2.

Voyons maintenant si ces courbes théoriques sont aussi satisfaisantes au point de vue quantitatif. Les figures 6 et 7 permettent

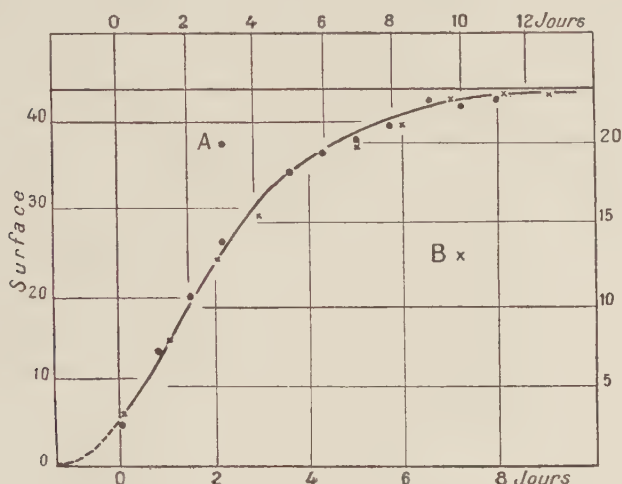


FIG. 6. — Croissance des cultures 11 651 A et B.

une comparaison directe des résultats du calcul et de ceux de l'observation. Les courbes qui y sont tracées sont des courbes théoriques calquées exactement sur celle de la figure 4. Un choix convenable des échelles de temps et de surface, fait séparément pour chacune des cultures sœurs *a* et *b* de chaque couple, permet d'utiliser le même graphique pour représenter simultanément la croissance des deux fragments comparés. La figure 6 représente les résultats de l'expérience 11 651, la figure 7 ceux de l'expérience 13 396 (voir tableau I). On voit qu'en tenant compte de la précision des déterminations de la surface d'une culture, l'ajustement obtenu peut être considéré comme tout à fait satisfaisant.

Le bon accord de l'expérience et de la théorie apporte donc un argument supplémentaire en faveur de l'hypothèse d'après laquelle deux facteurs, épuisement des réserves intracellulaires et locali-

sation périphérique des mitoses, suffisent parfaitement pour donner à la croissance résiduelle son allure caractéristique.

Nous devons noter à cet endroit que **Buch Andersen et Fischer** (1928) ont également proposé une loi de croissance des cultures. Leur équation qui s'écrit :

$$\frac{dr}{dt} = K - \alpha r$$

(r étant le rayon de la culture supposée circulaire) ou, après inté-

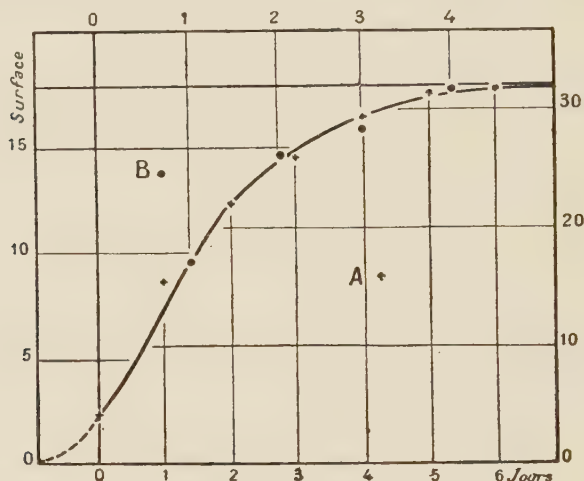


FIG. 7. — Croissance des cultures 13 396 A et B.

gration (en prenant pour origine le point : $r = 0$, $t = 0$),

$$r = \frac{K}{\alpha} (1 - e^{-\alpha t})$$

groupe les différents facteurs qui déterminent la vitesse de croissance en deux ensembles évalués chacun par un paramètre : K pour la constante de croissance et α pour la constante d'inhibition.

Buch Andersen et Fischer n'ont pas fait dans leur travail la distinction, à notre avis importante, entre la croissance résiduelle et la croissance en présence d'un milieu nutritif. Aussi leur équation semble s'appliquer mieux à la croissance des cultures nourries qu'à la croissance résiduelle que notre équation semble reproduire avec plus de fidélité. Dans ce dernier cas notre équation présente en outre l'avantage de ne pas invoquer l'action d'un facteur

inhibiteur tel que l'accumulation des substances de déchet dont nous avons trouvé le rôle négligeable dans l'arrêt de la croissance résiduelle¹.

B. — LA CROISSANCE DES CULTURES NOURRIES.

La croissance des cultures placées dans un milieu nutritif, représentée par une courbe (surface en fonction du temps) commence par être parabolique (fig. 8). La pente de la courbe, autrement dit

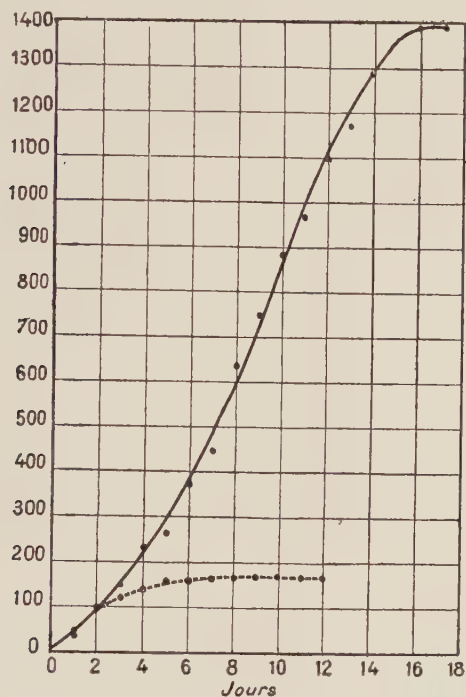


FIG. 8. — Croissance de deux cultures sœurs (12527-28) dont l'une (pointillé) est placée dans un milieu protecteur et l'autre dans un milieu nutritif.

l'intensité de la prolifération est, pendant une première période, fonction de la concentration dans le milieu des substances nutritives et inhibitrices. Si l'on place une série de cultures sœurs dans des milieux contenant de l'extrait embryonnaire en con-

1. On trouvera dans le mémoire que nous avons publié en collaboration avec G. Teissier tous les détails de cette analyse mathématique qu'il nous a semblé inutile de reproduire ici *in extenso*.

centration croissante, on obtient une série de courbes paraboliques qui ne diffèrent que par leurs pentes. Cette forme des courbes de croissance signifie évidemment que pendant une première période le taux de multiplication moyen reste constant.

La croissance parabolique des cultures peut durer selon les circonstances de dix à vingt jours. Ce n'est qu'au bout de ce temps que la courbe s'infléchit, marque un ralentissement assez brusque puis devient parallèle à l'axe des temps. La croissance s'arrête.

Examinons les raisons possibles de cet arrêt de croissance. Il semble *a priori* qu'on ne puisse invoquer dans ce cas l'épuisement de quelques substances de réserve puisque le milieu est fréquemment renouvelé et doit être considéré comme constant au point de vue de ses propriétés nutritives. On peut du reste reproduire en présence d'un milieu nutritif l'expérience de culture de deux fragments de taille inégale. Les résultats de plusieurs de ces expériences sont consignés dans les tableaux ci-dessous (II et III); les figures 9 et 10 représentent les résultats de deux de celles-ci.

TABLEAU II.

Grossissement : x25.

JOURS	N° 12 686			N° 12 784			N° 12 785		
	<i>a</i>	<i>b</i>	$\frac{a}{b}$	<i>a</i>	<i>b</i>	$\frac{a}{b}$	<i>a</i>	<i>b</i>	$\frac{a}{b}$
0	7,4	2,3	3,22	7,5	3,3	2,28	5,2	3,7	1,4
1	43,4	20,3	2,14	31,7	25,9	1,22	27,8	22,5	1,23
2	122,6	63,3	1,94	67,6	53,5	1,26	—	—	—
3	202,0	115,7	1,75	100,0	86,4	1,16	96,3	80,1	1,2
4	259,6	171,4	1,51	—	—	—	133,3	111,5	1,19
5	343,0	239,5	1,43	164,9	142,8	1,15	150,2	134,6	1,12
6	418,0	315,1	1,33	205,0	189,3	1,09	172,0	167,0	1,03
7							172,0	172,0	1,00
8							"	"	"

Il ressort de ces chiffres que, contrairement à ce qui se passe dans la croissance résiduelle, les tailles finales des colonies ne sont point proportionnelles aux tailles initiales lorsqu'il s'agit de cultures entretenues dans un milieu nutritif. Les tailles des deux cultures

TABLEAU III.

Grossissement : 16.

JOURS	N° 13 541			N° 13 543			N° 13 977		
	<i>a</i>	<i>b</i>	$\frac{a}{b}$	<i>a</i>	<i>b</i>	$\frac{a}{b}$	<i>a</i>	<i>b</i>	$\frac{a}{b}$
0	2,1	1,2	1,75	2,4	0,9	2,56	3,0	2,1	1,43
1	11,8	9,5	1,24	8,5	5,5	1,51	19,2	17,9	1,07
2	28,7	24,3	1,18	26,1	18,8	1,39	43,0	44,1	0,98
3	41,1	35,4	1,16	44,0	36,0	1,22	63,6	54,7	1,16
4	53,9	46,7	1,1	58,9	51,5	1,14	83,5	81,0	1,03
5	—	—	—	75,7	63,1	1,20	80,7	80,1	1,01
6	70,6	62,3	1,13	85,3	70,4	1,21			
7	—	—	—						
8	79,3	76,6	1,03	100,4	87,7	1,15			
9	»	»	»	»	»	»			
10	»	»	»						

JOURS	N° 14004			N° 14057			N° 14578		
	<i>a</i>	<i>b</i>	$\frac{a}{b}$	<i>a</i>	<i>b</i>	$\frac{a}{b}$	<i>a</i>	<i>b</i>	$\frac{a}{b}$
0	2,0	1,2	1,67	1,4	0,8	1,75	1,3	0,7	1,86
1	11,4	10,2	1,18	6,0	4,3	1,39	7,1	6,4	1,11
2	30,2	28,1	1,07	13,3	10,4	1,28	20,7	21,0	0,99
3	—	—	—	26,8	20,1	1,33	44,6	38,7	1,15
4	71,4	66,6	1,07	34,2	28,9	1,18	64,0	58,8	1,09
5	83,0	72,2	1,15	41,1	34,1	1,2	80,3	75,6	1,08
6	82,2	77,6	1,06	»	»	»	104,4	102,0	1,02
7	»	»	»				130,6	130,7	1,00
8							—	—	—
9							161,7	160,7	»
10							198,8	200,0	»
11							241,4	237,1	»
12							291,3	294,1	»
13							—	—	—
14							351,0	356,0	»
15							384,0	379,7	»
16							»	»	»

tendent, au contraire, dans ce cas à s'égaliser¹, ce qui, en effet, se trouve réalisé à la fin de quelques expériences. Lorsque l'on trace la courbe du rapport des surfaces des deux cultures (fig. 9 et 10 inférieures), on voit que ce rapport tend vers l'unité, qu'il l'atteint

1. Oliva (1931) a signalé un résultat analogue dans un mémoire récent.

quelquefois et qu'en tout cas la courbe ne passe pas obligatoirement par un minimum, ce qui était de règle lorsqu'il s'agissait de la croissance résiduelle. Ces expériences confirment donc ce que nous avons dit un peu plus haut, à savoir que l'accroissement de la surface des deux cultures est constant pendant un certain temps et montrent

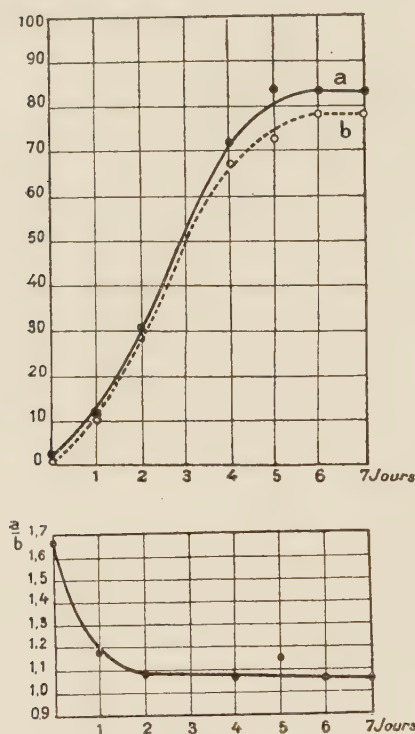


FIG. 9. — Croissance des cultures sœurs 14004 A et B dans un milieu nutritif. Variation du rapport des surfaces des deux cultures.

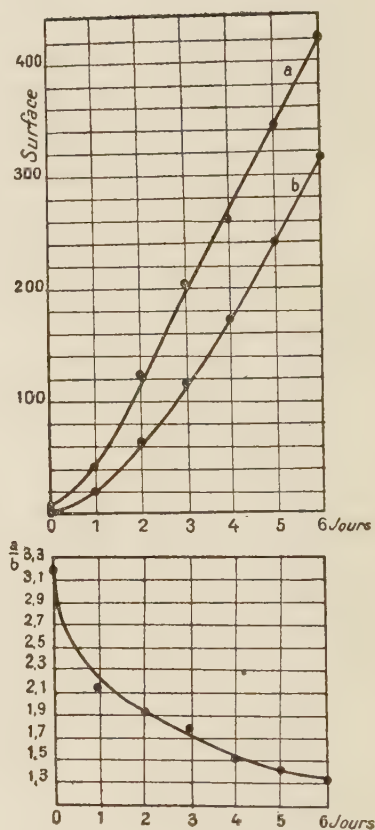


FIG. 10. — Croissance des cultures sœurs 12686 A et B dans un milieu nutritif. Variation du rapport des surfaces des deux cultures.

en plus que la croissance des cultures nourries est, comme celle des cultures en inanition, un phénomène périphérique.

Il est important de noter à cet endroit que les expériences que nous venons de citer n'aboutissent à ces résultats que dans un certain nombre de cas. Le rapport entre les surfaces finales des deux cultures égal à l'unité, représente pour nous un cas idéal et la discus-

sion des raisons pour lesquelles il n'est pas toujours réalisé sera plus à sa place un peu plus bas.

Ce n'est donc certainement pas l'épuisement de substances servant directement à la construction du protoplasme cellulaire qui cause l'arrêt de croissance des cultures entretenues dans un milieu nutritif. Faut-il croire alors que cet arrêt est causé par l'accumulation des substances de déchet? Plusieurs raisons semblent parler en faveur de cette hypothèse, d'autres semblent au contraire indiquer que des facteurs d'une nature différente doivent intervenir également.

Nous avons dit plus haut que les cultures entretenues dans des flacons Carrel dans un milieu nutritif présentent pendant un certain temps une croissance parabolique et que cette croissance pouvait durer, selon les circonstances, de dix à vingt jours. Or, **Carrel** a montré que la durée de cette période de croissance parabolique dépend dans une large mesure de la fréquence des renouvellements du milieu nutritif et des lavages des cultures. Ceci semble prouver que les lavages enlèvent chaque fois au coagulum les substances de déchet qui ont pu s'y accumuler. Seulement, peut-on être sûr que ces lavages enlèvent réellement la totalité de ces produits toxiques du métabolisme? Certes non, car le plasma coagulé présente une structure physique extrêmement complexe : le réseau de filaments de fibrine qui le constitue possède une surface énorme et il est extrêmement vraisemblable qu'il possède des facultés d'adsorption très considérables. Dans ces conditions, le repiquage des cultures constitue la seule manière de se débarrasser, à coup sûr, des substances de déchet et nous savons en effet que celui-ci est toujours suivi d'une reprise de la croissance; seulement nous allons voir un peu plus bas quel rôle à la fois important et complexe revient au traumatisme que comporte toujours ce repiquage, de sorte que nous n'avons pas le droit de tirer du fait de la reprise de croissance une conclusion définitive au sujet du rôle décisif de l'accumulation des substances de déchet.

Sans entrer pour le moment dans les détails des expériences que nous décrirons plus bas, nous pouvons dès à présent dire que la possibilité de régénération des cultures dont la croissance dans un milieu nutritif est arrêtée, parle également contre le rôle exclusif des substances de déchet.

Lorsqu'on compare les courbes de croissance d'une série de cultures placées dans des conditions identiques, on est souvent frappé par le fait qu'on se trouve en présence de quelques cultures dont la croissance ne s'arrête que lorsqu'elles atteignent une surface véritablement énorme et plusieurs fois plus grande que la surface finale moyenne. Comme l'épaisseur des différentes cultures¹ n'est pas très différente, il semble peu probable que les quantités absolues des substances de déchet accumulées dans les différents cas soient pareilles lorsque la surface de la culture est multipliée par 100 ou par 500. Ce raisonnement conduit donc également à la conclusion que d'autres facteurs doivent intervenir, à côté de l'accumulation des produits toxiques, pour causer l'arrêt de la croissance.

Il en est de même lorsque l'on pense aux exceptions fréquentes (que nous avons mentionnées plus haut) à la règle d'après laquelle le rapport des surfaces des deux cultures de taille inégale doit rapidement atteindre l'unité. Si l'on examine bien deux cultures sœurs de ce genre, on est, le plus souvent, frappé par le fait que le réseau cellulaire constituant la petite culture est beaucoup plus lâche que celui de la grande. Et ceci nous conduit à penser que l'architecture typique des colonies et l'interdépendance plus ou moins intime de leurs éléments jouent un rôle important dans la limitation de leur taille.

Essayons de nous rendre compte quelles sont les causes de la formation par les cultures d'un même tissu d'un réseau tantôt plus dense, tantôt plus lâche. L'accroissement d'une culture se compose, disons-nous, à la fois de l'émigration des cellules et de leur multiplication. Or, rien ne prouve que ces deux phénomènes sont liés entre eux d'une manière toujours identique et qu'ils sont influencés de façon identique par telle ou telle modification des conditions expérimentales.

Nous avons dit plus haut que lorsqu'on place des cultures sœurs dans des milieux de plus en plus nutritifs, les courbes de croissance de ces cultures présentent des pentes de plus en plus fortes; on pourrait s'attendre alors à ce que les différentes cultures atteignent la même taille finale dans des temps inversement proportionnels à l'in-

1. Bien entendu la comparaison n'est pas faite ici entre des cultures sœurs.

tensité de croissance. Or, il n'en est rien : le travail de **R. C. Parker** (1929) nous apprend qu'en faisant varier la concentration de l'extrait embryonnaire on modifie à la fois l'intensité de croissance et les tailles limites des colonies de quatre espèces cellulaires. Ce fait en apparence étrange s'explique, à notre avis, très simplement, si l'on admet que l'un des phénomènes, multiplication des cellules ou leur émigration, se trouve plus favorisé par des variations de la concentration de l'extrait embryonnaire que l'autre. Ici encore la taille finale plus ou moins grande d'une colonie serait donc directement liée à la densité plus ou moins grande des cellules dans une unité de surface, c'est-à-dire à l'un des paramètres de ce que nous avons appelé son architecture spéciale.

D'autres faits encore viennent à l'appui de cette manière de voir. Nous ne citerons que l'exemple des cultures d'origine très proche comme, par exemple, les fibroblastes normaux et les fibroblastes sarcomateux, dont les colonies peuvent présenter des tailles limites nettement différentes : d'après **Carrel et Ebeling** (1928) les colonies de fibroblastes normaux sont toujours plus petites que celles de fibroblastes sarcomateux. La comparaison des fibroblastes et des macrophages, dont les populations ne connaissent pas, semble-t-il, de limite de taille, est encore plus impressionnante car il s'agit ici d'une part de cellules dont les inter-relations sont sans aucun doute très intimes et d'autre part de cellules complètement indépendantes. Nous reviendrons plus bas sur le rôle des relations directes de cellule à cellule; retenons pour le moment qu'encore une fois la limite de taille nous apparaît comme liée à l'architecture du tissu.

Il ne sera pas sans intérêt à ce point de vue de signaler que dans leur essai d'interprétation mathématique des courbes de croissance des cultures, **Buch Andersen et Fischer** (1928) ont abouti à une équation qui comme nous l'avons dit plus haut (p. 20) groupe les divers facteurs qui régissent la croissance d'une culture en deux ensembles, évalués chacun par un paramètre unique, K pour la constante de croissance, α pour la constante d'inhibition, *ce facteur inhibiteur étant déjà présent au moment du départ*. Ce fait constitue, à notre sens, un argument nouveau en faveur de notre hypothèse, d'après laquelle la limitation de la taille des cultures

serait, en premier lieu, l'effet d'un facteur interne, lié à la nature même du tissu.

Ajoutons pour terminer qu'une hypothèse différente a été proposée par **Fischer** (1930) pour expliquer la limitation de la taille des cultures : cet auteur admet l'existence d'un « équilibre biodynamique » entre la masse du tissu et le volume du milieu. Nous discuterons plus bas, à propos de la régénération des cultures, les raisons qui parlent en faveur ainsi que celles qui s'opposent à une telle interprétation.

III. — LA RÉGÉNÉRATION « IN VITRO »

Les faits fondamentaux qui sont à la base des expériences qui seront décrites dans les pages suivantes, sont dus à **A. Fischer** et ont été publiés par lui dans un mémoire paru en 1930. Nous commencerons donc notre exposé par un résumé de ce mémoire, réservant pour plus tard la citation et la discussion des résultats décrits par **Fischer** dans un second mémoire, dont nous avons pris connaissance au cours de notre travail.

A. Fischer a montré que si l'on fait à une culture en vie ralentie, dont la croissance est pratiquement arrêtée, une blessure sous forme d'excision d'un secteur ou de la partie centrale, la colonie montre une nouvelle activité prolifératrice en remplissant l'endroit excisé d'une masse de cellules neuves. Cette sorte de cicatrisation ne s'arrête qu'au moment où le tissu néoformé a atteint la circonférence de la culture (dans le cas de l'excision d'un secteur) où lorsque la partie centrale excisée est comblée de cellules neuves.

L'enregistrement cinématographique, ainsi que le dénombrement des mitoses, ont montré à **Fischer** qu'il s'agit véritablement, au niveau de la blessure, d'une prolifération cellulaire active et non point de simple émigration des éléments préformés.

Cette prolifération ne commence qu'après un certain temps de latence qui est considérablement raccourci lorsqu'il s'agit de blessures répétées; d'autre part, la vitesse de la cicatrisation est inversement proportionnelle à l'âge de la culture; seulement cet âge doit être compté ici depuis le moment de la mise en flacon, car les cultures entretenues en milieu nutritif et constamment repiquées

ne vieillissent, pour ainsi dire, pas. Ce n'est que lorsqu'elles vivent à leurs propres dépens qu'apparaît le facteur de sénescence.

Fischer s'est naturellement demandé quels pouvaient être le mécanisme de cette réactivation de l'activité prolifératrice suspendue et les raisons de son nouvel arrêt lorsque la cicatrisation est terminée?

On pouvait supposer à première vue qu'il s'agit, lors de l'excision d'un fragment de la culture, d'une simple élimination des substances de déchet : comme la croissance est pratiquement arrêtée au moment de l'expérience, on pouvait en effet penser que cet arrêt était causé par l'accumulation de substances toxiques que l'on n'arrive plus à éliminer par les lavages. Pour décider de l'importance de ce facteur **Fischer** fait l'expérience suivante : il excise un fragment du coagulum dans le voisinage immédiat de la culture et de telle sorte qu'aucune cellule ne soit blessée; il remplit ensuite l'espace formé par une goutte de plasma frais. Si l'arrêt de la croissance était causé par l'accumulation des substances de déchet et si la régénération était due à leur élimination, une réactivation de la prolifération devrait se produire dans ce cas aussi, dans la région formée par du plasma frais. Or, l'expérience montre qu'il n'en est rien et que la culture garde parfaitement sa forme circulaire. La reprise de la prolifération après un traumatisme n'est donc certainement pas due à l'élimination des substances de déchet.

Dès lors, la reprise de la prolifération peut, d'après **Fischer**, avoir pour cause, soit la rupture d'un équilibre entre le nombre des cellules, autrement dit entre la masse des tissus, et le milieu, soit la mise en liberté, par les cellules traumatisées, de quelques substances capables de stimuler la prolifération des cellules voisines, soit, enfin, les deux éventualités à la fois.

Un argument en faveur de la seconde hypothèse est constitué par le fait que, d'après les observations de **Fischer**, la blessure accélère non seulement la prolifération au niveau du traumatisme, mais encore celle de l'ensemble de la culture. D'autre part, la preuve directe de la réalité des substances stimulantes mises en liberté par les cellules lésées est fournie par l'expérience qui consiste à ajouter à des cultures normales les liquides de lavage de cultures blessées et intactes : d'après **Fischer** la vitesse de croissance des

fibroblastes est accélérée dans ces conditions par l'addition du liquide surnageant des cultures blessées, tandis que l'addition du liquide de lavage de cultures intactes n'a aucune action.

En ce qui concerne l'hypothèse de la rupture, au moment de la blessure, d'un équilibre entre la masse du tissu et le milieu de culture, le travail de **Fischer** ne contient pas de faits tirés de l'observation de la régénération *in vitro*. Cela nous permettra de ne pas nous attarder sur ce point dont la discussion sera plus à sa place un peu plus bas.

* * *

Le second travail de **Fischer** (1930) contient, à côté d'une quantité de faits venant confirmer ces premiers résultats, une série d'expériences et d'idées nouvelles. Celles-ci rentrent cependant tout à fait dans le cadre de nos préoccupations personnelles, et c'est pourquoi leur exposé sera plus suggestif au fur et à mesure de la description de nos propres expériences que nous allons aborder maintenant.

A. — RECHERCHES PERSONNELLES.

Comme on a pu voir par ce qui précède, la régénération *in vitro* présente deux phénomènes principaux : ce sont, d'une part, la réactivation de la prolifération dans la région traumatisée d'une culture dont la croissance se trouve pratiquement arrêtée et, d'autre part, un nouvel arrêt de la croissance lorsque la cicatrisation est terminée. Il n'y a aucune raison, *a priori*, pour croire que ces deux phénomènes relèvent d'un mécanisme unique. Bien au contraire : comme l'a fait remarquer **Fischer** lui-même, une coupe linéaire à travers une culture peut provoquer une simple cicatrisation, tandis que deux coupes linéaires et parallèles (avec élimination de la partie intermédiaire) peuvent être suivies de la régénération d'une masse importante de tissu; le nombre de cellules lésées est cependant le même dans les deux cas, et si le phénomène de régénération reposait entièrement et uniquement sur la libération d'une certaine quantité de substances stimulantes, la croissance quantitativement très différente dans les deux cas serait difficile à comprendre. Il semble donc

qu'on ne doive pas perdre de vue la nature double du phénomène de régénération, et c'est pourquoi nous allons nous efforcer d'envisager la *stimulation de la croissance* et sa *limitation* séparément, l'une après l'autre.

Technique. — Le problème de régénération *in vitro* n'a pu être abordé par **Fischer** qu'au moment où une nouvelle méthode permettant de régler la vitesse de croissance des tissus a été introduite (**Fischer et Parker**, 1929). Cette méthode, connue sous le nom de *culture en vie ralentie*, a été adoptée par nous sans modification. **Fischer et Parker** (1929) sont partis de la considération que dans l'organisme les cellules puisent toutes les substances nécessaires à leur entretien dans le plasma sanguin. Ils cherchent donc à créer *in vitro* des conditions se rapprochant le plus possible de celles qui règnent dans l'organisme adulte ayant terminé sa croissance active et à cet effet ils éliminent du milieu de culture le constituant qui produit la prolifération intense, caractérisant la culture des tissus dans sa technique classique, c'est-à-dire l'extrait embryonnaire, qu'ils remplacent par le plasma. Pratiquement la technique est la suivante :

On repique une culture de la manière habituelle dans un flacon Carrel contenant les proportions normales (1 : 2) de plasma et de Tyrode. On coagule le mélange en ajoutant une goutte d'extrait embryonnaire très dilué. On élimine ensuite les traces d'extrait embryonnaire en couvrant le coagulum par 2-3 centimètres cubes de Tyrode; ce lavage se produit à la température ordinaire et dure trente à soixante minutes, après quoi on aspire le liquide et on bouche le flacon qui est ensuite porté à l'étuve. On laisse le tissu proliférer pendant deux-trois jours. A ce moment on lave de nouveau le coagulum avec 2-3 cm³ de Tyrode pendant une à deux heures (à 39°); ensuite on remplace le liquide de Tyrode par 0 cm³, 25 à 0 cm³, 50 de plasma hépariné à 10 p. 100 (10 p. 100 d'une solution d'héparine à 1 p. 1 000), qu'on laisse séjourner dans le flacon (à l'étuve) pendant trois à quatre heures; enfin on vide et bouche le flacon qu'on ne manipule plus pendant une nouvelle période de deux à trois jours, et ainsi de suite.

Les substances nutritives que la culture trouve à sa disposition

dans ces conditions ne sont nullement inférieures à celles que les cellules peuvent trouver dans l'organisme; mais elles n'ont évidemment rien à faire avec les conditions de très forte stimulation et de « suralimentation » que réalise la technique classique.

Nous ne reviendrons pas ici sur l'allure de la croissance des cultures dans ces conditions; à ce sujet l'essentiel a été dit page 9.

Pour ce qui est de la technique des excisions même, nous nous limiterons à dire que dans la très grande majorité des expériences, celles-ci ont été pratiquées à l'aide de couteaux à cataracte, dont l'usage est courant dans la culture de tissus et auxquels on donnait quelquefois une forme incurvée. Dans quelques expériences dans lesquelles il s'agissait d'exciser des fragments de culture d'une forme



FIG. 11. — Emporte-pièce pour excision de fragments de cultures.

et d'une surface constantes, nous avons fait usage d'un emporte-pièce spécial (fig. 11). Cet instrument a été préparé par notre mécanicien en perçant longitudinalement une tige d'acier fondu (diamètre 1 mm.) biseautée à l'une des extrémités et affûtée à la pierre après la trempe. Une ouverture latérale, percée à la lime ronde, permet l'évacuation des fragments prélevés. Les opérations à l'emporte-pièce étaient réalisées dans des flacons Carrel ouverts en haut.

Après l'excision, nous remplissions l'espace formé par une goutte de plasma qui coagulait spontanément ou par addition d'une trace d'extrait embryonnaire très fortement dilué.

Résultats expérimentaux. — Examinons d'abord les facteurs qui influencent la vitesse de la régénération.

Nous devons nous demander, en premier lieu, si l'accélération de la prolifération au niveau de la blessure est réelle? Nous avons vu plus haut, que la prolifération des cellules a lieu surtout à la périphérie des cultures; d'autre part, **Fischer** (1930) a montré qu'il en est de même dans la régénération : dans le cas d'une blessure centrale, le nombre des mitoses au niveau du bord libre interne

est beaucoup plus grand que dans l'intérieur de la culture et, d'après **Fischer**, sensiblement égal à celui qu'on trouve à la périphérie d'une culture après le repiquage. La régénération est donc, comme la croissance normale, un phénomène périphérique et les mitoses se rencontrent, dans les deux cas, dans la zone de la culture où les cellules se trouvent dans un entourage en quelque sorte asymétrique (**Fischer**) : d'un côté elles sont entourées de cellules appa-

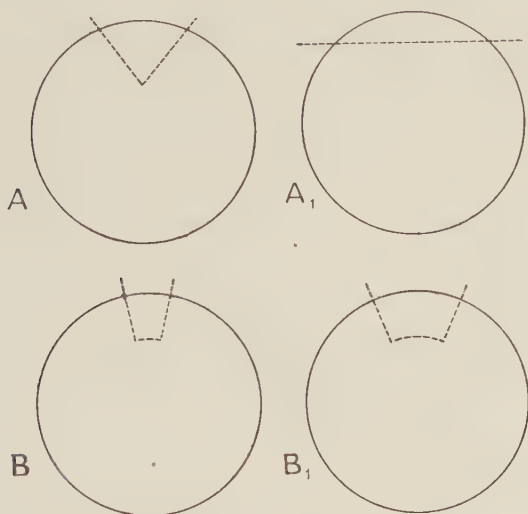


FIG. 12. — Schéma de l'excision de fragments de différentes formes.

remment semblables, de l'autre, par le milieu libre de tout élément cellulaire. Si l'on admet avec **Fischer** que cette situation est capable de créer un certain déséquilibre, de nature d'ailleurs encore inconnue, on comprend qu'il faille attribuer à cette zone périphérique (*freie Randzone* de **Fischer**) une importance spéciale et qu'on puisse se demander si ce n'est pas simplement la création d'une périphérie nouvelle et (dans le cas des blessures centrales ou en secteurs) plus longue que la périphérie normale, qui donne l'apparence d'une accélération de la croissance au niveau des blessures.

Plusieurs faits montrent cependant que l'accélération de la croissance au niveau des blessures n'est point apparente.

On peut, d'une part, réaliser, conformément au schéma de la figure 12 (A et A₁), des blessures en enlevant non pas un secteur

mais un segment de la culture et produire, de la sorte, non pas un allongement, mais au contraire un raccourcissement du bord libre de la culture; dans ce cas néanmoins, l'allure générale de la cicatrisation n'est point modifiée et la culture récupère, en fin d'expérience, la forme circulaire.

On peut, d'autre part, mesurer directement l'intensité de la régénération et la comparer à l'intensité de croissance. La localisation périphérique de l'activité prolifératrice nous autorise en effet à rapporter l'accroissement journalier de la surface ancienne et nouvelle à la longueur de bord correspondante et nous permet d'obtenir, de cette façon, des valeurs comparatives de l'intensité de croissance dans les parties blessée et intacte d'une même culture.

Nous avons opéré de la manière suivante. Des cultures pures de fibroblastes ont été entretenues en flacons Carrel D-3 pendant huit à vingt jours en vie latente. Pendant cette première période, elles étaient donc entretenues selon la méthode de **Fischer**, décrite plus haut. Les mesures des cultures étaient effectuées toutes les vingt-quatre heures, avec un grossissement linéaire de 23 diamètres. Après huit à vingt jours, nous excisions un secteur plus ou moins grand de la culture et remplissions l'espace formé avec quelques gouttes de plasma qui coagulait spontanément. De nouveau le contour de la culture était dessiné. La cicatrisation se produisait au bout de trois à huit jours (selon l'âge de la culture). Toutes les vingt-quatre heures, on faisait des mesures de la partie ancienne de la culture, ainsi que de la surface cicatrisée (au planimètre). D'autre part, nous nous sommes servi d'un curvimètre pour déterminer la longueur des bords (ancien et nouveau) de la culture.

Nos expériences nous ont montré que l'activité prolifératrice mesurée de la manière décrite est toujours plus élevée du côté blessé.

Les courbes de la figure 13 ainsi que le tableau IV donnent les résultats d'une de nos expériences. Il s'agit d'un cas extrême où la croissance active de l'ensemble de la culture est terminée (son intensité tend vers 0) au moment où on lui a fait deux blessures (16^e jour). On voit que malgré cela la cicatrisation commence le lendemain. La vitesse de régénération, très appréciable, passe par un maximum, puis baisse et tombe à zéro au vingt-cinquième

jour. A ce moment la cicatrisation est terminée : la nouvelle couche de cellules a atteint la périphérie de la culture.

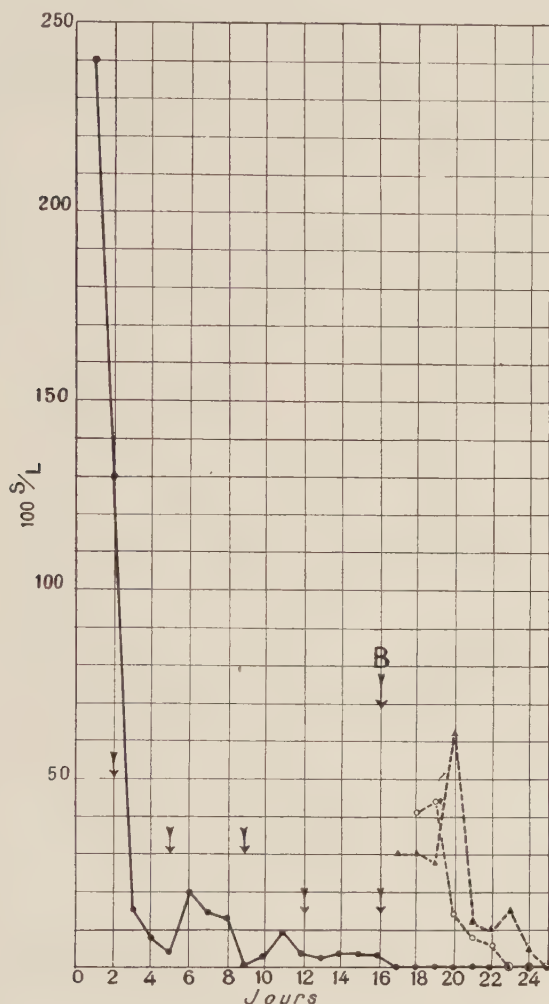


FIG. 13. — La courbe en trait plein représente l'intensité de prolifération par unité de longueur du bord libre de la partie ancienne de la colonie; les courbes pointillées, celles des parties blessées. Les petites flèches indiquent les moments des lavages (suivis d'une légère accélération de la croissance); la grande flèche indique le moment de la blessure. Les temps sont portés en abscisse. En ordonnée, le quotient $100 \frac{\text{Surface nouvelle}}{\text{Longueur du bord}}$ (Culture 10 865).

Dans ce cas, nous avons donc une cicatrisation active en absence de toute croissance de la partie ancienne de la culture. La vitesse de

régénération est donc supérieure à la vitesse de croissance au même moment et l'accélération au niveau du traumatisme n'est point apparente, mais réelle.

Ceci ne peut cependant aucunement diminuer l'importance de la création d'un bord libre; seulement, on doit en conclure que ce n'est pas l'allongement de celui-ci qui cause la différence dans la vitesse de prolifération.

Examinons maintenant quelle peut être l'influence de la grandeur du fragment excisé sur la vitesse de la régénération. Pour ceci il est indispensable de faire deux opérations sur la même culture car la vitesse de la régénération peut varier assez fortement d'une culture à l'autre même lorsqu'elles sont placées dans des conditions identiques.

TABLEAU IV.
Culture n° 10 865.

JOURS	100 $\frac{\text{SURFACE NOUVELLE}}{\text{LONGUEUR DU BORD}}$		
	Ancienne partie.	Grande blessure.	Petite blessure.
1	240	—	—
2	130	—	—
3	15	—	—
4	8	—	—
5	4	—	—
6	20	—	—
7	14,9	—	—
8	13,0	—	—
9	0,4	—	—
10	2,4	—	—
11	9,0	—	—
12	3,5	—	—
13	2,6	—	—
14	3,5	—	—
15	3,5	—	—
16 (Blessure)	3,1	0	0
17	0	30	0
18	0	30	41
19	0	28	44
20	0	62	14
21	0	12	8
22	0	10	6
23	0	15	0
24	0	5	0
25	0	0	0

Adressons-nous d'abord au cas le plus simple, représenté en B et B₁, figure 12. Il s'agit de blessures par excision de portions d'anneau de profondeur égale, mais de largeur différente. L'expérience montre que les durées de cicatrisation de deux blessures de ce genre sont sensiblement égales, ce qui est facile à comprendre si l'on songe que la cicatrisation se fait, dans ce cas, surtout à partir du fond de la blessure¹ et que la surface à combler est sensiblement proportionnelle à la longueur de ce fond. Ce résultat constitue en outre une nouvelle preuve du fait que la régénération,



FIG. 14. — Cicatrisation des deux blessures de la culture 10 865 enregistrée toutes les 24 heures.

comme la croissance normale des cultures, est un phénomène périphérique.

Si, au lieu de faire des blessures de profondeur égale et de surface inégale comme dans les expériences que nous venons de décrire, on excise à une même culture deux secteurs de profondeur différente, on obtient des résultats différents et, comme nous le verrons plus bas, particulièrement importants pour l'interprétation du phénomène. Les résultats de quatre expériences de ce genre sont donnés par le tableau V.

On voit que dans ce cas la durée de la cicatrisation dépend de la surface de la blessure sans lui être proportionnelle. Les rapports des surfaces cicatrisées sont, dans l'ordre des numéros des cultures : 2,39; 1,77; 2,06; 1,38; et les rapports des durées de cicatrisation correspondantes sont : 1,4; 1,00; 1,2; et 1,17. On doit en conclure que *les intensités de régénération sont plus grandes pour les blessures plus profondes*, résultat que nous allons retrouver plus bas.

1. La prolifération à partir des sections radiales est au contraire très faible et tardive.

TABLEAU V.

JOURS (Après blessure.)	SURFACE CICATRISÉE (en p. 100).							
	N° 10 865		N° 12 093		N° 14 815		N° 14 818	
	A	B	A	B	A	B	A	B
1	6,7	0	0	0	0	0	0	0
2	25,7	35,5	13,2	33,0	15,6	10,2	10,0	18,3
3	39,2	74,2	31,5	63,5	39,4	32,7	38,2	46,6
4	78,4	87,1	52,5	82,0	85,0	83,0	50,3	63,2
5	89,1	100,0	76,0	90,0	92,0	100,0	61,8	82,2
6	97,3	—	100,0	100,0	100,0	—	87,5	100,0
7	100,0	—	—	—	—	—	100,0	—
Surface cicatrisée (cm ²).	7,4	3,1	22,0	12,4	16,1	7,8	13,3	9,6

Mais ces expériences font entrevoir d'autre part l'importance que peut avoir la situation d'une blessure pour la vitesse de sa cicatrisation. Et comme cette vitesse de cicatrisation peut être la résultante de vitesses d'une série de mécanismes dont l'ensemble constitue le phénomène de la prolifération, nous avons peut-être la possibilité de déterminer le rôle de ces différents « paramètres » de la vitesse de régénération en faisant varier la situation des blessures.

Dans une série d'expériences exécutées à l'aide d'un emporte-pièce (fig. 11) et dans des conditions qui, par ailleurs, ne différaient en rien des conditions décrites à propos des expériences précédentes, nous avons excisé des fragments ronds tantôt dans le centre des colonies, tantôt à leur périphérie.

Comme le montrent les figures schématiques 15 A et A₁, la cicatrisation d'une blessure centrale se fait par des couches concentriques. Le tissu de cicatrisation d'une blessure de la même forme mais excentrique forme au contraire (fig. 15 B et B₁) une figure en demi-lune, la partie la plus large de celle-ci, correspondant par conséquent à une prolifération plus rapide, étant tournée vers le centre de la culture. La fermeture de cette blessure se fait donc, comme le montre clairement la figure 16, d'une manière excentrique.

Si l'on observe d'heure en heure la cicatrisation d'une telle bles-

sure, on remarque que l'accroissement plus faible du tissu de cicatrisation du côté distale de la blessure est dû à deux phénomènes distincts : d'une part le temps de latence est plus long ici : les premières cellules apparaissent beaucoup plus tard ici que du côté

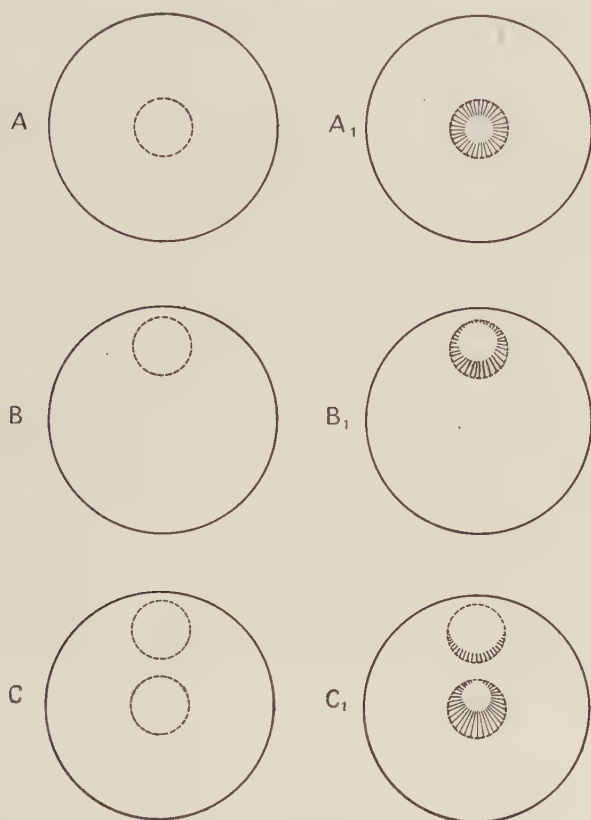


FIG. 15. — Représentation schématique des excisions pratiquées à l'aide de l'emporte-pièce. En A blessure centrale et sa cicatrisation. En B blessure périphérique et sa cicatrisation. En C combinaison des deux opérations précédentes.

proximal; d'autre part la prolifération une fois mise en train reste moins intense.

Regardons maintenant ce qui se passe lorsque l'on combine les deux opérations décrites sur une même culture. Les figures 15 C et C₁ schématisent le résultat de cette double opération. On voit que l'allure de la cicatrisation de la blessure centrale se trouve influencée par la présence d'une seconde blessure : sa cicatrisation

prend l'allure de la cicatrisation d'une blessure périphérique (tissu de cicatrisation en demi-lune). Il faut ajouter à cela que la cicatrisation de la blessure périphérique est à son tour sensiblement ralentie et qu'elle commence d'habitude plus tôt que la cicatrisation de la partie proximale de la blessure centrale; de ce côté, la cicatrisation de la blessure centrale est donc retardée par rapport au côté opposé, qui commence à proliférer au même moment que la blessure périphérique.

Nous avons pensé d'abord qu'un facteur important de la durée du temps de latence était le changement de la polarité de la cellule : on pourrait expliquer ainsi le fait que le temps de latence dans la cicatrisation d'une blessure périphérique était beaucoup plus long pour les cellules qui devaient proliférer dans une direction centripète que pour les cellules qui prolifèrent dans la direction normale, c'est-à-dire centrifuge. Mais l'observation d'une série de cultures sœurs, à une partie desquelles nous avons fait des blessures centrales et à l'autre des blessures périphériques, a montré que la croissance centripète des premières commençait à peu près au même moment que la croissance centrifuge des secondes. Le renversement complet de la polarité des cellules ne représente donc qu'une fraction très petite du temps de latence; il en est peut-être autrement dans le cas des sections radiales où les cellules doivent proliférer dans une direction perpendiculaire au rayon de la culture; mais ici la prolifération est, d'une manière générale, trop faible pour que l'on puisse en tirer une conclusion.

Ceci étant, l'interprétation des faits décrits n'est point difficile. La comparaison des figures 15 A₁, B₁, C₁ montre clairement que l'intensité de la croissance à partir d'un point quelconque de la section est toujours proportionnelle à la masse de tissu que limite cette section. Dans le cas A la masse de tissu est pareille de tous les côtés de la blessure centrale. Dans le cas B le nombre de cellules en rapport avec un point quelconque de la section est très grand du côté central et très petit du côté périphérique : aussi la croissance est considérablement plus forte du côté central. Enfin, dans le cas C, la blessure centrale est ramenée, au point de vue de l'entourage cellulaire, dans les conditions d'une blessure périphérique et nous voyons en effet, que sa cicatrisation adopte parfaitement l'allure

correspondante. La vitesse de prolifération d'une cellule dans la régénération est donc, comme dans la croissance normale, fonction du nombre des cellules avec lesquelles elle se trouve en communication. Et si la régénération est, comme la croissance, un phénomène périphérique parce que seules les cellules placées au bord libre de la culture prennent une part active à la prolifération, les deux



FIG. 16. — Microphotographie d'une culture (14 212) en voie de régénération.
Blessure périphérique.

phénomènes, croissance et régénération, sont, d'autre part, des phénomènes de masse parce que, dans l'un comme dans l'autre, les cellules périphériques puisent les principes nécessaires à leur multiplication dans toute la masse des cellules auxquelles elles sont réunies.

Si cette interprétation est exacte le temps de latence ne serait vraisemblablement pas autre chose que le temps nécessaire pour l'afflux de ces principes cellulaires de la croissance vers les cellules périphériques. Nous reviendrons avec plus de détails sur la nature de ces principes dans le chapitre consacré à l'origine de la forme des colonies.

* * *

Après avoir défini ainsi quelques-unes des règles qui régissent la réactivation de la croissance après le traumatisme, nous pouvons essayer maintenant d'analyser les causes de ce phénomène.

Nous avons déjà dit plus haut que la réactivation de la croissance ne peut pas être expliquée par la simple élimination des substances de déchet accumulées dans le coagulum fibrineux. **Fischer** (1930) a montré que des fragments de tissu, implantés dans le voisinage de cultures dont la croissance est arrêtée, prolifèrent d'une façon sensiblement normale. De même que **Fischer**, nous avons souvent laissé le fragment excisé, dans des expériences de régénération, à côté de la culture traumatisée : la croissance de ce fragment a toujours eu lieu. Rien d'étonnant à cela, car nous avons montré en étudiant la croissance résiduelle que l'arrêt de cette croissance n'est certainement pas dû à l'accumulation des produits toxiques du métabolisme cellulaire. Enfin, un résultat important est rapporté dans le deuxième mémoire de **Fischer** : le lavage des cultures traumatisées, destiné à éliminer les substances de déchet, loin d'atteindre le résultat cherché et d'activer la croissance, la ralentit au contraire. Cette expérience, reproduite par nous à plusieurs reprises toujours avec le même résultat, suggère immédiatement la conclusion que c'est le traumatisme même qui est responsable de la reprise de la multiplication cellulaire.

Nous avons déjà dit en résumant le premier travail de **Fischer** que la réactivation de la prolifération devait être attribuée, au moins en partie, à la mise en liberté, lors du traumatisme, de substances stimulantes. Les preuves de la réalité de ces substances sont, rappelons-le encore une fois, de trois sortes : d'une part les expériences de lavage des cultures que nous venons de décrire, d'autre part la stimulation de la croissance de l'ensemble de la colonie par le traumatisme, enfin l'action des liquides de lavage sur la croissance des cultures intactes.

Mais si l'on se souvient que toutes ces expériences sont exécutées sur des cultures en vie latente dont la croissance est pratiquement terminée, autrement dit dont l'énergie résiduelle est épuisée au moment de la blessure; et si l'on pense que, malgré cela, des bles-

sures répétées sont capables de réveiller l'activité prolifératrice suspendue et, par suite, mener à une importante augmentation de la masse de tissu, on doit en conclure avec **Fischer** que les substances mises en liberté lors du traumatisme ne sont pas des substances nutritives proprement dites, mais plutôt des corps, de nature

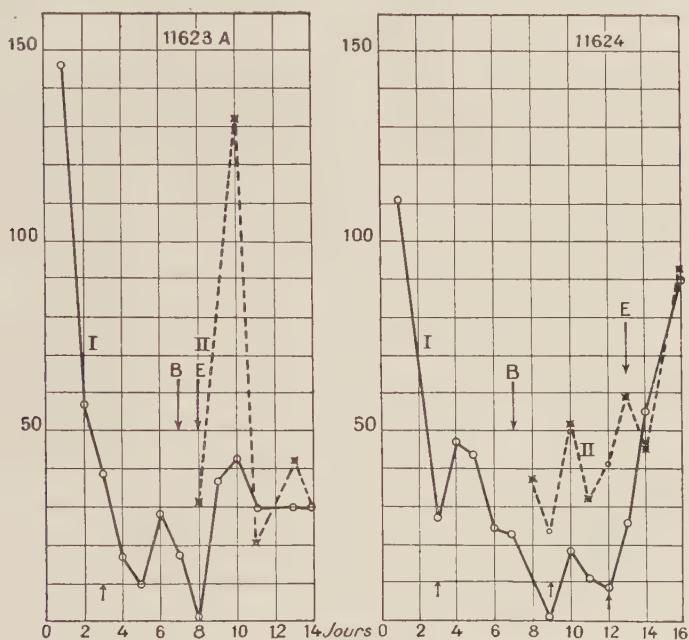


FIG. 17. — Les courbes I représentent l'intensité de croissance de la partie ancienne de la culture; les courbes II, celle de la partie blessée. Les petites flèches indiquent les moments de lavage. Les flèches B, le moment de la blessure. Les flèches E, le moment d'addition d'extrait embryonnaire. (Les temps sont portés en abscisse. En ordonnée le rapport $100 \frac{\text{Surface nouvelle}}{\text{Longueur du bord}}$.)

sans doute catalytique, capables de modifier le métabolisme des cellules.

Nous avons montré plus haut que la croissance au niveau de la blessure était accélérée par rapport à la croissance de l'ensemble de la colonie au même moment. Cette croissance accélérée du côté blessé doit correspondre forcément à une utilisation meilleure des substances présentes dans le milieu de culture, due, peut-être, justement à l'intervention des substances libérées par le traumatisme.

Les expériences décrites par nous ont été réalisées avec des cultures proliférant dans un milieu très faiblement nutritif et dont la croissance était très faible ou nulle au moment de la blessure. Malgré cela, le traumatisme provoquait une très forte augmentation de la vitesse de croissance au niveau de la blessure. Il semblait

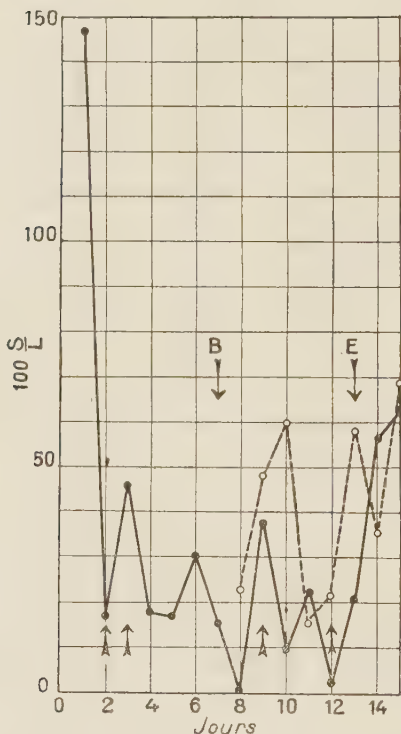


FIG. 18. — La courbe en trait plein représente l'intensité de croissance de la partie ancienne de la culture; la courbe pointillée celle de la partie blessée. Les petites flèches indiquent les moments de lavage. La flèche B, le moment de la blessure. La flèche E, le moment d'addition d'extrait embryonnaire. (Les temps sont portés en abscisse. En ordonnée le rapport $100 \frac{\text{Surface nouvelle}}{\text{Longueur du bord}}$.) (Culture 11 620.)

donc indiqué de reproduire ces expériences en présence d'un milieu plus nutritif pour comparer l'action d'un tel milieu sur la croissance des parties blessées et non blessées d'une culture.

Dans cette nouvelle série d'expériences la technique employée était la même que dans nos expériences antérieures. Des colonies de fibroblastes étaient cultivées conformément à la nouvelle technique de **Fischer** jusqu'au moment où leur prolifération devenait très lente. A ce moment une blessure leur était faite sous forme d'excision d'un secteur. La régénération commençait, selon l'âge de la culture, le lendemain ou le surlendemain.

Alors, quelques cultures recevaient de l'extrait embryonnaire dilué à 20-30 p. 100; d'autres n'en recevaient que plus tard, lorsque la régénération était en pleine marche

ou lorsqu'elle touchait à sa fin. Les mesures étaient faites toutes les vingt-quatre heures.

Le tableau VI et les figures 17, 18 et 19 donnent les résultats de quatre expériences de ce genre. Les chiffres inscrits dans le tableau

et portés en ordonnée sur les graphiques représentent l'intensité de croissance (surface formée par unité de longueur du bord libre de la culture) calculée comme dans les expériences décrites page 34.

TABLEAU VI.

JOURS	INTENSITÉ DE CROISSANCE							
	N° 11 623 Bless. au 7 ^e jour. Addition de jus au 8 ^e jour.		N° 11 624 Bless. au 7 ^e jour. Addition de jus au 13 ^e jour.		N° 11 620 Bless. au 7 ^e jour. Addition de jus au 13 ^e jour.		N° 10 861 Bless. au 8 ^e jour. Addition de jus au 12 ^e jour.	
	A ⁽¹⁾	B ⁽²⁾	A ⁽¹⁾	B ⁽²⁾	A ⁽¹⁾	B ⁽²⁾	A ⁽¹⁾	B ⁽²⁾
1	146,6	—	111,2	—	146,6	—	215,0	—
2	56,9	—	—	—	16,8	—	150,0	—
3	38,4	—	26,9	—	46,4	—	20,0	—
4	16,8	—	47,0	—	17,4	—	15,0	—
5	8,7	—	43,7	—	17,0	—	25,0	—
6	28,4	—	24,6	—	30,6	—	15,0	—
7	17,1	—	23,0	—	15,1	—	15,0	—
8	0	30,9	—	36,0	0	22,9	31,0	—
9	36,4	90,0	0	22,8	38,4	48,0	1,0	31,0
10	42,0	132,5	18,3	52,0	9,8	60,0	8,0	35,0
11	28,8	20,0	11,1	32,0	22,2	15,4	6,0	40,0
12	21,0	2,0	8,4	40,7	2,1	21,1	35,0	56,0
13	30,2	42,0	25,6	58,3	20,7	58,3	29,0	107,0
14	29,0	29,9	55,1	44,7	56,2	35,3	96,0	111,0
15	—	—	—	—	63,3	68,5	59,0	91,0
16	—	—	90,8	93,7	—	—	86,0	82,0

(1) Ancien bord.

(2) Blessure.

Ces expériences montrent que le tissu en régénération réagit à l'addition d'extrait embryonnaire plus fortement que le reste de la culture. Mais l'intensité de la réaction dépend du moment où l'extrait embryonnaire est fourni aux cultures. Comparons, par exemple, les figures 17 *a* et *b*. Les deux cultures ont été blessées au septième jour. La cicatrisation a commencé le lendemain. A ce moment, la culture 11 623 A a reçu 0,5 centimètres cubes d'extrait embryonnaire à 25 p. 100. On voit que, dès le lendemain, la réaction se produit mais qu'elle est infiniment plus intense du côté blessé (courbe II). Malgré l'accélération de la prolifération de l'ensemble de la colonie, la cicatrisation est pratiquement terminée au dixième jour. A ce moment, la courbe baisse et rejoint celle

représentant l'intensité de croissance de l'ensemble de la culture. La régénération commence au huitième jour également pour la culture 11 624. L'intensité de régénération présente deux maxima dus au lavage et à l'addition de plasma frais. La cicatrisation se produit donc en absence d'extrait embryonnaire. Elle est à peu près terminée au treizième jour; à ce moment la culture reçoit $0,5 \text{ cm}^3$ d'extrait embryonnaire à 25 p. 100, comme la culture 11 623 A. On voit que, malgré cela, l'intensité de croissance de la partie blessée baisse pour rejoindre celle de la partie ancienne. Ce n'est qu'ensuite que les deux courbes remontent de manière identique. La réaction de la partie blessée à l'extrait embryonnaire cesse donc d'être plus intense que celle de la partie ancienne de la culture dès que la régénération est terminée et la circonférence atteinte. Tout se passe comme si l'intensité de la régénération (ou l'intensité de la réaction à l'extrait embryonnaire du tissu en régénération) était fonction de l'éloignement de la couche proliférante périphérique du tissu de cicatrisation du centre de la colonie, conclusion à laquelle nous a déjà conduit l'étude des blessures de différentes profondeurs (p. 37).

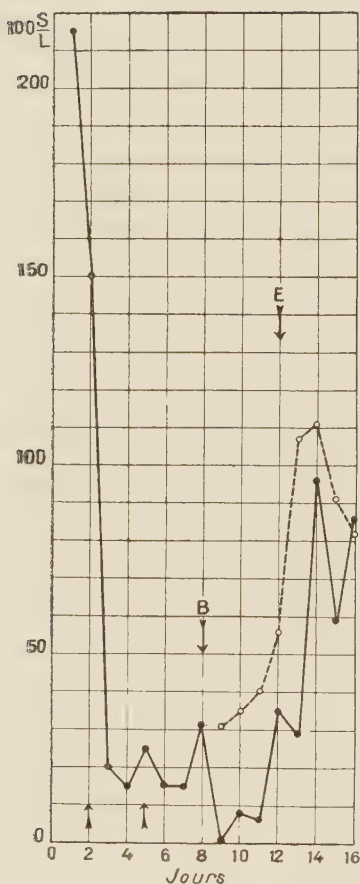


FIG. 19. — La courbe en trait plein représente l'intensité de croissance de la partie ancienne de la culture; la courbe pointillée, celle de la partie blessée. Les petites flèches indiquent les moments de lavage. La flèche B, le moment de la blessure. La flèche E, le moment d'addition d'extrait embryonnaire. (Les temps sont portés en abscisse. En ordonnée le rapport

$100 \frac{\text{Surface nouvelle}}{\text{Longueur du bord}}$) (Culture 10 861.)

La régénération présente deux maxima dus au lavage et à l'addition de plasma frais. La cicatrisation se produit donc en absence d'extrait embryonnaire. Elle est à peu près terminée au treizième jour; à ce moment la culture reçoit $0,5 \text{ cm}^3$ d'extrait embryonnaire à 25 p. 100, comme la culture 11 623 A. On voit que, malgré cela, l'intensité de croissance de la partie blessée baisse pour rejoindre celle de la partie ancienne. Ce n'est qu'ensuite que les deux courbes remontent de manière identique. La réaction de la partie blessée à l'extrait embryonnaire cesse donc d'être plus intense que celle de la partie ancienne de la culture dès que la régénération est terminée et la circonférence atteinte. Tout se passe comme si l'intensité de la régénération (ou l'intensité de la réaction à l'extrait embryonnaire du tissu en régénération) était fonction de l'éloignement de la couche proliférante périphérique du tissu de cicatrisation du centre de la colonie, conclusion à laquelle nous a déjà conduit l'étude des blessures de différentes profondeurs (p. 37).

Il ressort d'autre part de ces expériences que la formation des substances stimulantes lors du

traumatisme ne suffit pas à elle seule pour rendre compte quantitativement du phénomène de régénération. Nous avons déjà dit que, comme l'a fait remarquer **Fischer**, la lésion d'un même nombre de cellules peut, selon la forme de la blessure, provoquer la formation de quantités plus ou moins importantes de tissu. Le même fait ressort des expériences où nous avons prélevé à des cultures tantôt des secteurs, tantôt des segments : le nombre de cellules lésées par ces deux opérations peut être sensiblement égal, tandis que la masse de tissu régénéré peut être très différente. Ces expériences prouvent que très souvent la culture *pourrait régénérer* beaucoup plus de tissu qu'elle n'en *régénère en réalité* et que, par conséquent, nous sommes ici en présence d'un second phénomène : *la limitation* de la multiplication cellulaire.

Ce qui frappe surtout dans toutes ces expériences, c'est le fait que dans aucune condition on n'arrive à provoquer la croissance du tissu de régénération au delà de la circonférence de la culture. Même l'addition d'extrait embryonnaire ne nous a jamais fourni ce résultat.

Sur quoi repose la limitation de la croissance compensatrice après blessure? Elle n'est pas due à l'épuisement des substances stimulantes puisque la quantité de celles-ci n'est pas forcément proportionnelle à la surface à cicatriser. D'autre part elle ne peut pas être expliquée par l'accumulation des substances de déchet. Nous avons vu en effet que les lavages ne suffisent pas pour faire repartir une culture arrêtée dans sa croissance. Il ne peut donc s'agir ici que de produits non diffusibles accumulés dans le coagulum. Mais, dans cette hypothèse, on ne comprend pas pourquoi la croissance d'une culture pourrait durer une vingtaine de jours, tandis que sa régénération s'arrêterait au bout de quatre à cinq jours. Il est extrêmement peu vraisemblable que la même quantité de produits toxiques s'accumule, dans les deux cas, dans des périodes de temps si différentes et indépendamment de la quantité de plasma prélevé en dehors de la culture (expériences personnelles).

On a invoqué également (**Olivo**, 1931) le vieillissement spontané du plasma. Mais la remarque que nous venons de faire s'applique également à cette hypothèse; l'action de ce facteur encore ne peut donc être que secondaire.

La limitation de la prolifération cellulaire dans la régénération apparaît donc sous le même aspect que la limitation de la croissance normale et nous fait insister avec encore plus de force sur la nécessité de faire appel à des facteurs plus généraux régissant la croissance de la population cellulaire constituant la colonie, en tant qu'un ensemble.

A ce propos il sera intéressant de noter que, contrairement à nous, **Fischer** a observé, dans quelques cas, la croissance du tissu de cicatrisation au delà de la circonférence, après addition d'extrait embryonnaire. Seulement d'après **Fischer** lui-même, il s'agit là d'un phénomène transitoire, reposant sur l'inégalité des temps de latence, et qui est bientôt compensé par un accroissement plus fort des autres parties de la culture¹ : *le fait de la régulation de la croissance de l'ensemble*, sur lequel nous voulons attirer l'attention, n'en ressort qu'avec plus de clarté.

Il devient donc évident que la blessure que nous faisons à une culture en lui excisant un fragment constitue la rupture d'un équilibre quelconque. Ce qui nous reste maintenant c'est de discuter la nature possible de cet équilibre.

On sait que toute une série de travaux, en particulier de **Robertson**, ont mis en évidence l'existence d'un équilibre, de nature encore très peu claire, entre le nombre d'individus composant une population d'organismes libres et le volume du milieu. Ainsi, dans le cas des élevages de Daphnies, par exemple, **Langhans** (1909) a montré que le nombre d'individus (dans un milieu non renouvelé et à volume constant) tend vers une limite. Une fois cette limite atteinte, l'addition d'un certain nombre d'individus supplémentaires de la même espèce provoque la mort d'un nombre correspondant d'individus. La suppression de quelques organismes provoque, au contraire, une multiplication nouvelle qui ramène la population au nombre initial.

D'après **Fischer**, un équilibre de ce genre existerait également dans une culture de tissus et le traumatisme aurait pour premier effet la rupture de cet équilibre entre la masse vivante et le milieu de culture.

1. Le désaccord entre les résultats de **Fischer** et les nôtres n'est donc qu'apparent.

La différence entre une population d'organismes et une culture de tissus résiderait, à ce point de vue, uniquement dans le fait que le traumatisme comporte, dans le dernier cas, une libération de substances stimulantes.

Une telle interprétation rencontre cependant des difficultés. La plus grave, à notre sens, est constituée par le fait (p. 13) que la taille finale d'une colonie proliférant dans les conditions d'inanition est réglée par la quantité de réserves intracellulaires et n'est donc pas forcément en équilibre (dans le sens de **Fischer**) avec le milieu de culture. Il en est de même, sans aucun doute, des cultures en vie ralentie, puisque même des cultures entretenues en milieu nutritif sont, d'après quelques expériences que nous avons eu l'occasion de réaliser, capables de régénérer après l'arrêt de la croissance.

D'autre part, il est aisé de montrer que la régénération d'une culture ne mène pas obligatoirement au rétablissement de la masse initiale. Si,

par un artifice technique, on découpe de grandes cultures en des fragments de forme très allongée, et si l'on ensemente ces fragments dans un milieu dépourvu d'extrait embryonnaire, la croissance des fragments s'arrête avant que la forme ronde ait pu être rétablie. On obtient de cette façon des cultures de forme elliptique. Si l'on fait à une telle culture une blessure en lui excisant un secteur (fig. 20 a) la régénération de cette culture ne diffère en rien de la régénération d'une culture ronde. Si, au contraire, on

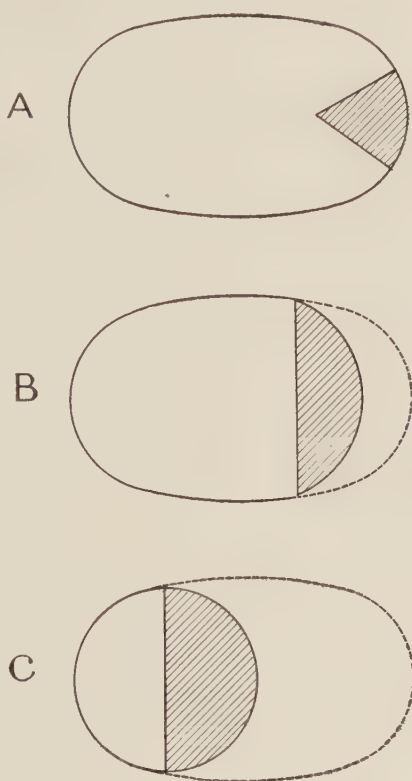


FIG. 20. — Schéma de la régénération d'une culture elliptique.

excise une grande partie de la culture en laissant seulement un demi-cercle (fig. 20 c) la régénération ne mène point à la reformation de la masse initiale. Elle s'arrête au moment où la culture a retrouvé sa forme ronde.

Il ressort de ces expériences que la forme de l'ensemble cellulaire joue dans les phénomènes en question un rôle au moins aussi important que sa masse.

B. — ORIGINE DE LA FORME CIRCULAIRE DES CULTURES.

Amenés ainsi à attribuer une importance considérable à la forme circulaire des cultures *in vitro*, nous devons chercher à comprendre son origine, c'est-à-dire le mécanisme de sa formation dans les conditions normales et de son rétablissement dans la régénération.

Il est étonnant de voir que la forme ronde caractéristique des cultures n'a jamais retenu l'attention des chercheurs : ce fait est dû, sans aucun doute, à ce qu'il était naturel de s'attendre à la formation, par un fragment de tissu d'une forme initiale quelconque, d'une figure circulaire, vu les conditions homogènes, symétriques du milieu de culture¹.

Pour expliquer la forme circulaire des cultures, l'hypothèse la plus simple consiste en effet à admettre que la croissance radiaire d'une culture présente une intensité homogène dans toutes les directions et que, par suite, les différences très petites entre les différentes dimensions d'un fragment carré, par exemple, doivent très rapidement devenir négligeables par rapport au rayon et amener la culture à la forme « pratiquement » circulaire.

Il était bon toutefois de soumettre cette hypothèse très simple à une vérification expérimentale : pour cela il était juste nécessaire de projeter l'image d'une culture qui venait d'être repiquée et de dessiner son contour, puis de refaire de temps en temps la même manipulation.

Un calcul extrêmement simple permet de voir quelle devrait être la multiplication de la surface de la culture si la forme circulaire reposait uniquement sur la diminution de la différence relative entre les diamètres.

1. Voir à ce sujet P. Weiss (1929).

Dans les conditions d'une bonne technique les différents diamètres d'une culture normale diffèrent rarement entre eux de plus de 5 p. 100, lorsque la culture a pour origine un fragment carré. Traçons à travers le centre d'un tel fragment deux droites perpendiculaires aux côtés du fragment et une diagonale. Nous obtenons ainsi le triangle rectangle ABC (fig. 21). Prenons AB pour unité; AC est alors = 1,4 et 0,4 est la différence la plus grande entre les différentes dimensions de la culture. Il est aisé maintenant de voir pour quel accroissement du rayon la différence = 0,4 deviendra inférieure à 5 p. 100 du rayon. On

peut en effet écrire, si l'on admet qu'une culture circulaire peut présenter encore 5 p. 100 de différence entre les différents diamètres

$$\frac{1,4 + L}{1 + L} = \frac{105}{100}$$

(L étant l'accroissement du rayon), d'où l'on tire : $L = 7$.

La forme circulaire, telle que nous venons de la définir, sera donc

atteinte lorsque le rayon de la culture sera passé de 1 à 8, ce qui, en surface (compte tenu de la forme carrée initiale et de la forme circulaire finale), fait une multiplication de 50 fois.

Dans l'hypothèse de l'accroissement radiaire homogène, la surface de la culture devrait donc être multipliée par 50 pour que la forme circulaire (à 5 p. 100 près) soit réalisée. Or la pratique montre qu'elle est atteinte lorsque la surface se trouve multipliée par 4 à 6.

Il devient donc extrêmement probable que l'accroissement d'une culture n'est pas homogène dans les différentes directions.

On peut essayer de mettre en évidence les différences probables de l'intensité de prolifération dans les différentes directions d'une manière directe. Nous avons procédé de la manière suivante : nous avons choisi plusieurs cultures de fibroblastes particulièrement régulières et les avons repiquées sur mica en goutte pendante, ayant soin de couper des fragments d'une forme parfaitement carrée. Aussitôt après le repiquage, nous marquons sur la lamelle de mica un trait au diamant, puis nous projetons les cultures à l'aide de

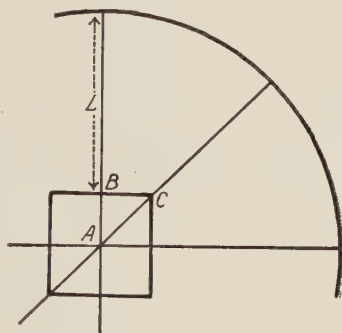


FIG. 21. — Explication dans le texte.

l'appareil de Edinger et dessinions le contour des cultures ainsi que les traits de diamant qui devaient servir de points de repère pour le dessin suivant (fig. 22). Les cultures étaient placées ensuite à l'étuve.

Vingt-quatre et quarante-huit heures plus tard de nouveaux dessins étaient faits sur la même feuille en superposant l'image du trait de diamant au trait marqué. On pouvait alors mesurer sur le dessin

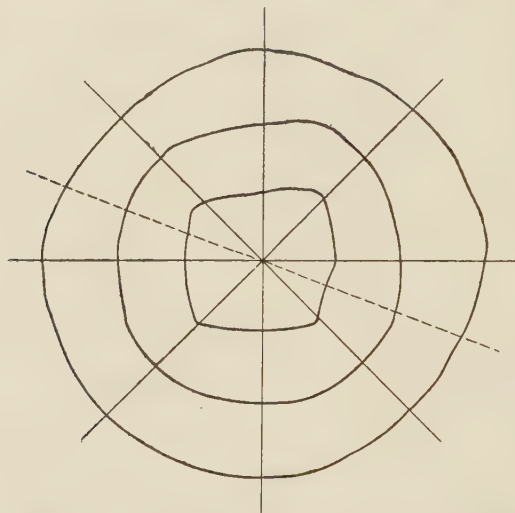


FIG. 22. — Croissance d'une culture enregistrée 24 et 48 heures après le repiquage. Le pointillé indique le trait au diamant servant de repère. Les traits pleins indiquent les directions dans lesquelles ont été effectuées les mesures de l'accroissement du rayon. (Culture 13491 A.)

l'accroissement du rayon de la culture, c'est-à-dire la distance séparant le contour du fragment transplanté de celui de la culture de vingt-quatre ou de quarante-huit heures. Comme il s'agissait de mesurer l'intensité de la croissance dans les différentes directions, nous tracions à travers le centre de la culture 4 droites qui découpaient la culture en des segments de 45° et mesurions l'accroissement du rayon dans ces différentes directions. La figure 23 donne les résultats de ces mesures représentés graphiquement dans un système de coordonnées orthogonales¹. La courbe supérieure représente l'accroissement du rayon (en millimètres) tandis que

¹ Procédé emprunté à P. Weiss (1929).

la courbe inférieure donne la distance des points correspondants de la périphérie du centre du fragment. On voit nettement que l'accroissement du rayon n'est pas régulier dans les différentes régions de la culture : la courbe présente 4 maxima, correspondant aux côtés du fragment explanté et 4 minima correspondant aux angles.

On pouvait se demander si ce phénomène ne tenait pas à une contraction plus grande de certaines régions du fragment lors du repiquage ou à un étalement plus facile. Pour éliminer ce facteur, nous avons refait des mesures analogues en mesurant cette fois la distance séparant le contour tracé vingt-quatre heures après le repiquage de celui tracé quarante-huit heures après celui-ci. La contraction du fragment et son étalement n'interviennent plus ici : à ce

moment on se trouve, en effet, déjà en présence d'une large zone de tissu néoformé. Les résultats de nos mesures furent cependant pareils aux résultats précédents.

La forme ronde repose donc, contrairement à l'hypothèse qui semblait être la plus naturelle, sur un accroissement inégal de la culture dans les différentes directions.

Avant d'aller plus loin et d'essayer d'interpréter les phénomènes de régulation de la forme des cultures à l'aide des faits que nous venons d'observer, arrêtons-nous un instant sur la nature des forces qui déterminent la migration centrifuge des cellules, caractéristique des cultures *in vitro*.

Rappelons d'abord que le phénomène de prolifération se compose à la fois de la multiplication et de l'émigration cellulaire. Nous ne savons pas encore dans quelle mesure ces deux phénomènes sont

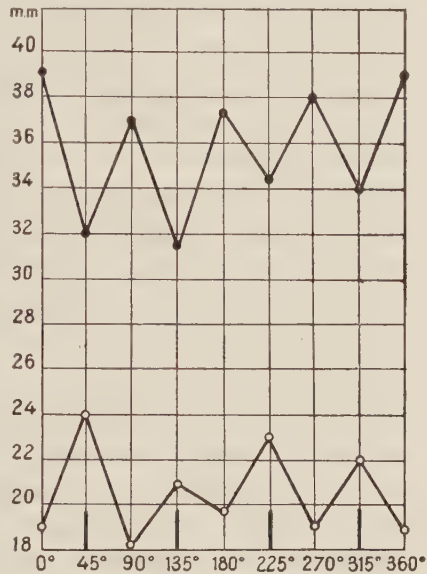


FIG. 23. — Accroissement des rayons de la culture 13 491 A. Les traits épais verticaux indiquent les angles du fragment initial.

liés entre eux; il est évident cependant que c'est le mouvement cellulaire qui détermine l'*orientation* de la croissance qui seule nous intéresse en ce moment.

Pour ce qui est du mouvement des cellules, on sait actuellement que celui-ci comporte deux mécanismes distincts : d'une part l'ami-boïsme des cellules, d'autre part un glissement dû à un entraînement passif de la cellule, ce dernier mécanisme étant de loin prédominant (**Fauré-Fremiet** et **Wallich**, 1925). Nous n'allons pas discuter ici le mécanisme intime des mouvements cellulaires au sujet desquels on trouvera tous les renseignements dans l'excellente revue récente de **Fauré-Fremiet** (1930) et n'envisagerons ici que les facteurs plus généraux qui orientent ce mouvement d'une certaine manière. On a voulu attribuer (**L. Loeb**, **R. Harrison**) le mouvement centrifuge des cellules en culture à leur *stéréotropisme*, c'est-à-dire à leur affinité pour les surfaces solides. On sait en effet que la présence d'un substratum solide est une condition *sine qua non* de la migration des cellules. Seulement, à lui seul, ce facteur ne rend pas compte du phénomène. On a, d'autre part, invoqué le *cytotropisme négatif* des cellules. Ceci n'est cependant qu'une manière de classer le phénomène, sans avancer en quoi que ce soit son interprétation.

L'acidification progressive du tissu, due à l'accumulation du CO_2 , a été également invoquée (**Burrows**) pour rendre compte de la migration cellulaire en vertu, cette fois, d'un *chimiotropisme*. Toutefois aucune preuve directe de cette hypothèse ne semble exister.

Enfin la diffusion de certains produits du métabolisme cellulaire déterminant un abaissement de la tension superficielle des cellules et provoquant ainsi leur déplacement a été invoquée par **Burrows** (1926). Les expériences de cet auteur l'ont conduit à formuler sa théorie de la migration des cellules dans laquelle un rôle important revient à une substance à laquelle l'auteur donne le nom de *ergusia* et qui ne serait qu'un produit de transformation d'une autre substance hypothétique, l'*archusia*, étant en rapport direct avec le métabolisme cellulaire et provoquant, en particulier, à une certaine concentration, la division cellulaire.

Cette théorie, un peu confuse dans son ensemble, a cependant l'avantage de reposer, pour ce qui est du mouvement cellulaire, sur quelques faits d'observations fort suggestifs. Ainsi **Burrows** a pu

montrer que si l'on réalise un système d'irrigation continue qui enlève continuellement les produits diffusibles, la migration est très faible où même nulle. Il a montré, d'autre part, que la masse du tissu joue un rôle important : plus elle est petite, plus la migration des cellules est retardée. Ces faits rendent infiniment probable l'hypothèse de **Burrows** sur l'intervention, dans la détermination du mouvement cellulaire, d'un produit du métabolisme cellulaire. Nous ne discuterons pas ici la nature de ce produit, ni surtout sa parenté possible avec d'autres principes tels que les nécrohormones de **Haberlandt** (1921), etc., question sur laquelle nous comptons revenir dans un autre travail.

Remarquons que **Fauré-Fremiet** et **Walich** également ont observé la diffusion, à partir des fragments de tissus, de substances formant à la surface du liquide un film monomoléculaire. **Fauré-Fremiet** et **Wallich** attribuent à ce film le rôle d'entraîner les cellules dans un mouvement passif.

L'action de la diffusion d'un produit du métabolisme cellulaire sur la vitesse et l'orientation du mouvement cellulaire et, par conséquent, sur le déterminisme de la forme des cultures, semble donc extrêmement vraisemblable. Cette constatation nous a conduit à réaliser quelques expériences sur des modèles (diffusion d'un produit coloré) que nous allons décrire rapidement pour montrer l'analogie entre les phénomènes de diffusion et l'accroissement des cultures.

Nous avons réalisé nos expériences de la manière suivante : nous avons préparé une solution de gélose à 2 p. 100 dans l'eau distillée et l'avons partagée en deux portions ; à l'une de celles-ci nous avons ajouté quelques centimètres cubes d'une solution concentrée de permanganate de potassium. Une petite quantité de cette solution était versée dans une boîte de Pétri. Après refroidissement, on découpait dans la gélose solidifiée un petit cube qu'on plaçait dans une autre boîte de Pétri. Celle-ci était placée dans une cuvette contenant de l'eau glacée. On versait ensuite dans la boîte Pétri une quantité de gélose incolore suffisante pour recouvrir le petit cube coloré. Comme l'opération se produisait à température basse, la gélose incolore se prenait en gel très rapidement et la dissolution de la gélose colorée n'avait pas le temps de se produire.

Dès la prise en gel nous plaçons la préparation sur l'appareil à projections et dessinons le contour du cube coloré exactement comme s'il s'agissait d'un fragment de tissu. Au bout de peu de temps la diffusion du permanganate commençait et nous enregistrons par des dessins successifs l'accroissement de la zone colorée.

Nous avons pu constater de cette manière que très rapidement la zone de diffusion devenait circulaire. Ce n'est que dans les premiers instants que la diffusion est homogène sur tout le pourtour de la pièce colorée; très vite elle devient plus rapide le long des côtés du cube que dans la région des angles; et, cette différence

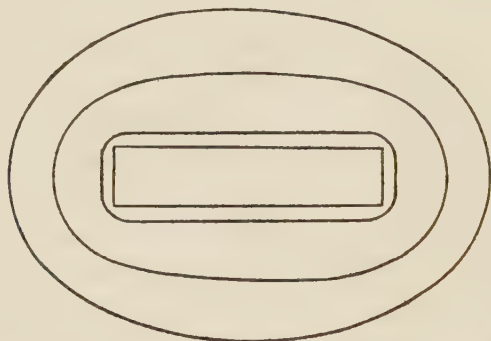


FIG. 24. — Phases successives de la diffusion à partir d'un fragment allongé de gélose.

s'accroissant de plus en plus, on aboutit très rapidement à une figure parfaitement circulaire.

Nous avons pensé que les étapes successives du phénomène apparaîtraient avec plus de clarté encore, si l'on remplaçait le fragment carré par un fragment allongé. Comme le montre la figure 24, la diffusion comporte dans ce cas trois phases successives : dans un premier temps le contour de la zone colorée s'élargit en restant parallèle aux côtés de la pièce colorée; dans un second temps la diffusion devient plus faible à partir des angles de sorte que le contour de la zone de diffusion devient convexe par rapport aux côtés de la pièce; cependant l'accroissement maximum des rayons est identique à partir des côtés larges et des côtés étroits de celle-ci. Enfin dans un troisième temps, l'accroissement du rayon perpendiculaire aux côtés larges de la pièce devient plus fort que celui du rayon perpendiculaire aux côtés étroits. En somme, au lieu de

deux étapes que nous avons distinguées dans la diffusion à partir d'une pièce carrée, nous en distinguons ici trois.

Lorsque l'on considère deux points situés en dehors du fragment coloré, on voit immédiatement que le point situé en face d'un angle recevra, à un instant donné, la substance diffusant à partir d'une surface imbibée de colorant moindre que le point situé en face d'un côté. Il en est de même d'un point situé en face d'un côté étroit, comparé à un point situé en face d'un côté large (fig. 27 A).

Ce que nous venons de dire de la diffusion à partir d'un fragment

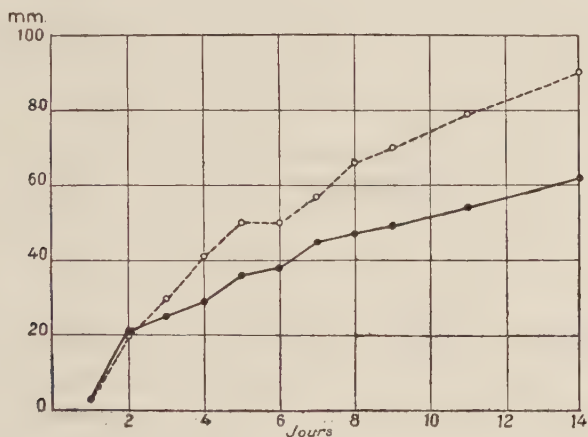


FIG. 25. — Accroissement des deux rayons d'une culture allongée (Culture 14 705).

carré de gélose ne manquera pas de donner l'impression que les deux phénomènes, accroissement de la zone de diffusion et accroissement d'une culture, se produisent selon des lois tout à fait similaires. Cette impression sera encore plus précise si l'on examine les deux courbes de la figure 25 qui représentent l'accroissement des deux rayons d'une culture allongée. Comme dans le cas d'un fragment de gélose de forme allongée on distinguera ici les deux étapes principales du phénomène¹ : l'accroissement des deux rayons (distance entre le bord de la culture et le bord du fragment explanté) est identique durant les premières quarante-huit heures; ce n'est qu'ensuite qu'apparaît une différence en faveur du rayon perpen-

1. En mesurant les rayons de la culture on confond naturellement le premier et le second temps du phénomène qu'on peut dissocier sur un dessin.

diculaire aux côtés larges du fragment, différence qui devient de plus en plus accusée avec le temps. La figure elliptique tend de plus en plus à se rapprocher d'un cercle.

Que l'on compare enfin les figures 26 A et 26 B, et l'on aura une

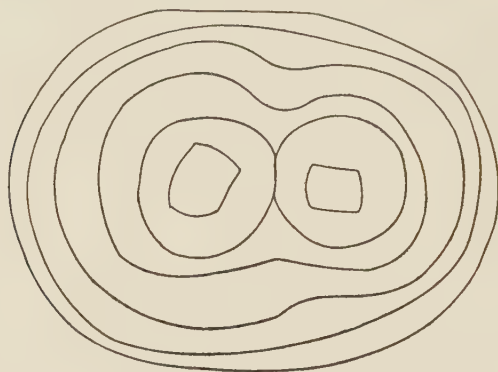


FIG. 26 A. — Croissance des deux cultures sœurs 14 418 A et B placées l'une près de l'autre.

troisième démonstration de l'analogie remarquable entre les deux phénomènes. La figure 26 B représente deux fragments carrés d'agar coloré inclus à une faible distance l'un de l'autre dans un gel de

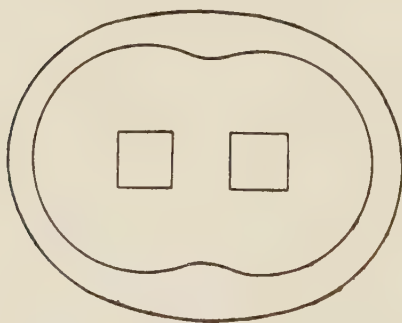


FIG. 26 B. — Diffusion à partir de deux fragments de gélose placés l'un près de l'autre.

gélose incolore. La figure 26 A représente deux cultures de fibroblastes plantées l'une près de l'autre. On verra que dans les deux cas, l'accroissement du contour se fait d'abord indépendamment dans les deux fragments; ce n'est qu'au moment où les deux contours, déjà circulaires, confluent en formant une figure en 8, que l'accroissement devient plus

fort à partir de la zone de confluence, ce qui fait que l'ensemble reproduit rapidement une figure elliptique.

L'analogie entre l'allure de la diffusion et la migration cellulaire dans les cultures est évidente et nous autorise, étant donné les

faits qui nous ont suggéré ces expériences, à admettre que la diffusion d'un produit du métabolisme cellulaire détermine l'orientation de la croissance *in vitro*. A partir de ce moment il nous semble logique de chercher l'explication des phénomènes de régénération dans les règles de la diffusion que nous pouvons établir.

Ceci ne sera pas difficile si l'on se souvient que la substance diffusible provient de l'ensemble de la culture et que la prolifération qu'elle provoque ne touche que les cellules périphériques.

Nous venons de voir que la diffusion à partir des angles est toujours plus faible que la diffusion à partir des côtés; il en est de même pour la croissance d'une culture à partir d'un fragment carré. Le schéma de la figure 27 B permet de comprendre ce phénomène : on voit en effet qu'à un instant donné un point situé au voisinage de l'angle reçoit le produit de diffusion d'une masse de tissu très petite par comparaison avec un point situé au milieu d'un

côté. Et ceci nous conduit immédiatement à la conclusion que, dans une culture, toute invagination sera l'origine d'une prolifération plus intense que le reste de la colonie (cas d'un secteur excisé) et qu'inversement la prolifération sera toujours plus faible au niveau d'une excroissance (cas de la régulation après addition d'extrait embryonnaire, d'après **Fischer**).

L'hypothèse de la migration provoquée par la diffusion d'un produit de métabolisme rend compte également de la migration centripète des éléments à la suite de l'excision du centre de la colonie; enfin, elle permet de comprendre la migration plus faible dans les directions perpendiculaires au rayon dans les blessures en secteur.

En somme l'hypothèse proposée semble apporter l'explication

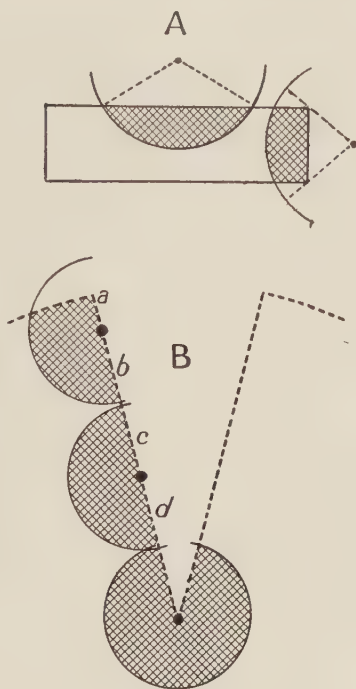


FIG. 27. — Explication dans le texte.

simultanée et, à notre avis, parfaitement suffisante de l'accélération de la prolifération au niveau des blessures et de sa régulation, c'est-à-dire de la « mise à l'unisson » de la vitesse de croissance et de la vitesse de régénération à la fin de la cicatrisation.

Enfin notre raisonnement nous conduit encore à une conclusion importante. Lorsqu'on essaie de se rendre compte de la quantité de substances qui arrivent à un instant donné vers une série de points situés au bord d'un secteur excisé, on constate que cette quantité doit être de plus en plus grande si l'on envisage successivement une partie périphérique, une partie moyenne et une partie profonde de la blessure (fig. 27 B). Nous retrouvons donc là un résultat expérimental cité plus haut, d'après lequel l'intensité de prolifération est d'autant plus grande que la blessure est plus profonde. L'existence de cette relation suffit parfaitement pour définir l'existence d'un gradient. Nous reviendrons plus bas sur ce point important.

Faute de données précises nous allons nous abstenir de la discussion de la nature possible des substances diffusibles invoquées. Constatons simplement que ce ne sont certainement pas des substances nutritives puisque les phénomènes décrits se produisent également dans un milieu nutritif. Du reste le mécanisme que nous avons invoqué ne vise, comme nous l'avons précisé plus haut, que l'émigration passive des cellules. On doit cependant chercher à relier ce phénomène à la multiplication cellulaire qui constitue la contre-partie aussi bien dans la croissance normale que dans la régénération.

Les liens qui unissent ces deux phénomènes, il faut l'avouer, ne sont pas connus. Il est cependant indiscutable qu'ils existent quoique la prolifération puisse reposer tantôt plutôt sur l'un, tantôt sur l'autre. Sont-ce les mêmes substances qui provoquent le mouvement et la multiplication des cellules? Nous ne le croyons pas puisque nous savons que beaucoup de facteurs peuvent influencer l'un des phénomènes sans toucher l'autre. Nous savons d'autre part que le déterminisme de la division cellulaire est complexe : nous devons par exemple distinguer les facteurs externes et internes; les facteurs « de possibilité » et les facteurs « de réalisation¹ ». L'état

1. Les *Möglichkeitsfaktoren* et *Verwirklichungsfaktoren* de A. Gurwitsch (1926).

actuel de nos connaissances ne nous permet pas d'aller au delà de quelques hypothèses.

D'accord avec **Fischer** nous croyons que la localisation des mitoses dans la périphérie des cultures doit attirer une attention particulière. Ce qui nous semble particulièrement suggestif c'est le fait que c'est dans cette région seule que le mouvement cellulaire est également possible et même plus : c'est ici qu'il est forcément provoqué. Ce fait nous paraît être une indication importante pour ce qui est de l'enchaînement causal des deux processus : à notre avis on est en droit de se demander si ce n'est pas le mouvement des cellules qui est le fait essentiel et si la division cellulaire n'en est pas le simple corollaire?

Nos expériences d'addition d'extrait embryonnaire à des cultures en voie de régénération semble venir à l'appui d'une telle manière de voir. Elles nous avaient montré en effet que les cellules bordan t la blessure acquièrent indiscutablement la faculté d'utiliser mieux les substances nutritives mises à leur disposition et que cette faculté est d'autant plus prononcée que les cellules se trouvent plus éloignées de la circonférence de la culture et plus proches de son fond. Or nous avons vu que l'émigration des cellules est la plus intense précisément à cet endroit parce que la diffusion y était la plus énergique. Il nous paraît logique de supposer alors que le même facteur qui provoque l'émigration des cellules, met la cellule dans un état favorable pour l'accomplissement des diverses synthèses qui caractérisent son accroissement et précèdent sa division.

IV. — CONCLUSIONS

Le fait essentiel qui se dégage des expériences décrites est que le comportement d'une cellule en culture est strictement subordonné à l'activité de l'ensemble des cellules composant cette culture.

L'étude de la croissance des cultures nous a montré que cette croissance n'est point anarchique, comme on a souvent voulu l'affirmer, mais qu'elle suit, au contraire, des lois très précises. Parmi les facteurs qui déterminent l'allure caractéristique des courbes de croissance l'un des plus importants est la localisation périphérique des mitoses : celle-ci est une manifestation de l'hété-

rogénéité de la population cellulaire constituant une culture, hétérogénéité qui apparaît sous l'influence de l'activité de l'ensemble cellulaire. Mais ce qui est important dans ce cas, c'est que cette hétérogénéité n'est encore pas quelconque, mais qu'elle est, au contraire, orientée d'une manière très précise selon le rayon de la culture : sous cette forme elle nous apparaît comme une ébauche d'organisation et de polarité.

Une certaine organisation orientée, reposant sur l'hétérogénéité des éléments, peut être considérée comme une première caractéristique d'un organisme.

Nous avons exposé plus haut une série de faits qui prouvent que le mouvement centrifuge des cellules est un mouvement passif dû à la diffusion, à partir de l'ensemble de la colonie, d'un produit du métabolisme. Ce produit, avons-nous dit, probablement par le fait même de provoquer le déplacement des cellules, met les cellules dans un état particulier, favorable à la division cellulaire. Du moment que ce principe est diffusible, sa concentration doit décroître à partir du centre de la colonie, vers la périphérie. Et du moment qu'il confère aux cellules quelques propriétés spéciales, ces propriétés cellulaires varieront forcément dans le même sens. Ainsi, dans une masse cellulaire, dont les produits du métabolisme exercent une influence sur ses éléments, l'apparition d'un gradient est inévitable. Dans une culture elle se manifeste, nous l'avons vu, par la faculté de régénération. Cette faculté, qui n'est qu'une conséquence de la première, est une deuxième caractéristique d'un organisme.

Rappelons maintenant le schéma du phénomène de régénération auquel nous sommes arrivés. Il peut se résumer sous la forme suivante : le traumatisme comporte la mise en liberté de substances stimulantes, de nature catalytique, qui activent le métabolisme de l'ensemble de la culture. Un produit de ce métabolisme diffuse dans le milieu et entraîne le mouvement des cellules périphériques. De ce fait même les cellules sont mises en un état favorable à l'action des facteurs déclenchant la division cellulaire. Ainsi apparaît un lien qui unit l'émigration des cellules et leur multiplication. Nous pensons que l'état de tension de la culture, dont on se rend compte par la rétraction qui suit instantanément toute section, est un facteur important de l'établissement de cet état particulier. Cette

conception trouve sans doute son analogue dans la notion de « tension de structure » de **H. Ribbert** (1928) récemment reprise par **Fauré-Fremiet** (1932).

Remarquons tout de suite que ce schéma, expliquant à notre avis d'une manière satisfaisante la régulation, c'est-à-dire la mise à l'unisson des vitesses de croissance et de régénération à la fin de la cicatrisation, n'explique point l'arrêt de la croissance en général. On se souvient que celui-ci n'a pas pu être expliqué complètement par l'accumulation des substances de déchet. Sans pouvoir pour le moment apporter une interprétation satisfaisante du phénomène et ne voulant pas nous hasarder dans des hypothèses gratuites, nous rappellerons simplement que l'architecture typique des tissus nous est apparue comme un facteur important de la limitation de la taille des cultures. En elle-même, cette limitation de la taille, liée à une certaine organisation, doit être considérée comme une troisième caractéristique d'un organisme.

Ainsi, l'analyse de la croissance et de la régénération des cultures nous a montré que, sous l'action de facteurs peu nombreux et relativement simples, les colonies cellulaires acquièrent déjà trois caractéristiques importantes d'un organisme. Ce sont : l'organisation orientée d'un matériel hétérogène, la régulation et la limitation de la taille. On nous dira peut-être que les facteurs dont nous avons invoqué l'action, peuvent intervenir également dans une colonie d'êtres monocellulaires. Très peu attachés aux aspects métaphysiques du problème, nous ne voyons rien de gênant dans cette objection : qu'on admette que l'unité fonctionnelle d'une colonie cellulaire provient des influences que les cellules exercent les unes sur les autres, et nous serons d'accord pour dire qu'un tube à essai rempli d'Infusoires peut présenter des caractéristiques d'individualité plus précises qu'un animal peu différencié, tel une Éponge.

*
* *

Nous nous abstiendrons ici de discuter si les facteurs que notre travail nous a montré importants dans la croissance des cultures trouvent leur analogue dans la croissance des organismes et dans

quelle mesure ils y sont transposables. Nous nous limiterons, pour terminer, à une remarque.

L'étude de la régénération nous a montré que la vitesse de régénération d'une blessure dépend en grande partie de sa profondeur. Il est important de noter que nous retrouvons là une des grandes lois de la régénération *in vivo*. On sait en effet que, dans beaucoup de cas, on a pu montrer que la régénération d'un membre ou même d'une partie du corps est d'autant plus rapide que l'ablation a porté sur une partie plus grande de l'organe en question. Dans les deux cas cette loi est une conséquence de l'existence d'un gradient métabolique. Dans une culture de tissu l'apparition et la persistance de celui-ci est le fait des corrélations. Rien d'étonnant alors que ce gradient d'une culture n'ait rien de fixe : après repiquage il réapparaîtra dans chacune des subcultures. Or, nous retrouvons là une autre conclusion que l'on peut tirer de l'étude de la régénération *in vivo*. Nous citerons à l'appui **P. Brien** (1930) qui, dans sa remarquable étude de la régénération chez les Ascidies, s'exprime ainsi :

« La polarité dans un organisme apparaît comme un phénomène physiologique actuel, conditionné par les corrélations fonctionnelles actuelles et par conséquent non fixée immuablement dans l'organisme » (p. 106).

V. — RÉSUMÉ

1° L'étude de la croissance et de la régénération dans les cultures de fibroblastes montre que l'activité des cellules est, dans ces cultures, strictement subordonnée à l'activité de l'ensemble.

2° Il en résulte qu'une culture de fibroblastes présente déjà trois caractéristiques importantes d'un organisme : l'organisation orientée d'un matériel hétérogène, la limitation de la taille et la régulation.

3° Ces trois propriétés des cultures sont le fait des corrélations intercellulaires. Quelques-unes de ces corrélations peuvent être ramenées à l'action de facteurs très simples, tels que la diffusion, à partir de l'ensemble cellulaire, d'un produit de métabolisme.

Index bibliographique.

- BUCH-ANDERSEN (E.) et FISCHER (A.), 1928. — Über die Wachstums und Hemmungs-funktion bei Gewebekulturen *in vitro*. *Arch. Entw. mechan.*, T. 114, p. 28.
- BRIEN (P.), 1930. — Contribution à l'étude de la régénération naturelle et expérimentale chez les *Clavelinidae*. *Ann. Soc. Roy. Zool. de Belg.*, T. 61, p. 19.
- BURROWS (M.-T.), 1926. — Energy production and transformation in protoplasmas seen through a study of the mechanism of migration and growth of body cells. *Contrib. from the Cancer Res. Lab.*, T. III, p. 289.
- CARREL (A.), 1923. — Measurement of the Inherent Growth Energy of Tissues. *J. exper. Med.*, T. 353, p. 521.
- et EBELING (A.-H.), 1921. — The Multiplication of Fibroblasts *in vitro*. *J. exper. Med.*, T. 304, p. 317.
- 1923. — Action of Serum on Fibroblasts *in vitro*. *J. exper. Med.*, T. 307, p. 759.
- 1923. — Survival and Growth of Fibroblasts *in vitro*. *J. exper. Med.*, T. 308, p. 487.
- 1928. — The fundamental properties of the fibroblast and the macrophage. III. The malignant fibroblast of sarcoma 10 of the Crocker Foundation. *Journ. Exp. Med.*, T. 48, p. 105.
- EPHRUSI (B.) et TEISSIER (G.), 1932. — Étude quantitative de la croissance des cultures de tissus. I. La croissance résiduelle. *Arch. f. Exp. Zellforsch.*, T. XIII, p. 1.
- FAURÉ-FREMIET (E.), 1930. — The Kinetics of Living Matter. *Trans. Farad. Soc.*, T. XXVI, p. 779.
- 1932. — Involution expérimentale et tension de structure dans les cultures de *Ficulina ficus*. *Arch. Anat. Micr.*, T. XXVIII, p. 121.
- et WALLICH (R.), 1925. — Un facteur physique du mouvement cellulaire pendant la culture des tissus *in vitro*. *C. R. Acad. Sc.*, T. 181, p. 1096.
- FISCHER (A.), 1925. — Beitrag zur Biologie der Gewebezellen. *Arch. f. mikrosk. Anat. u. Entw.-mechan.*, T. 104, p. 210.
- 1930. — Regeneration. *Cytologia*, T. I, p. 217.
- 1930. — *Gewebezüchtung*. Müller et Steinicke Ed., Munich.
- 1930. — Regeneration. Versuche an Gewebekulturen *in vitro*. *Virchows Arch.*, T. 279, p. 94.
- et PARKER (R.-C.), 1929. — Dauerzüchtung *in vitro* ohne Wachstumsbeschleunigung. *Arch. exper. Zellforsch.*, T. 8, p. 325.
- 1929. — The Occurrence of Mitosis in Normal and Malignant Tissues *in vitro*. *Brit. J. exp. Path.*, T. 10, p. 312.
- GURWITSCH (A.), 1926. — *Das Problem der Zellteilung physiologisch betrachtet*. Julius Springer, Berlin.
- HABERLANDT (G.), 1921. — Wundhormone als Erreger von Zellteilungen. *Beitr. z. Allg. Bot.*, T. 2, p. 1.
- LANGHANS, 1909. — (*Verhandl. d. Deutsch. zool. Ges. Frankfurt. a. M.* p. 282). Cité d'après Fischer, 1930).
- LEVI (G.), 1923. — I Fattori che regolano la migrazione e la moltiplicazione delle cellule coltivate *in vitro*. *Arch. di Fisiol.*, T. XXI, p. 283.
- OLIVO (O.), 1928. — Recenti contributi allo studio della morfologia e biologia dei tessuti coltivati *in vitro*. *Boll. Soc. Ital. di Biol. sperim.*, T. III, p. 1229.
- 1931. — Das qualitative und quantitative Wachstum der Gewebe *in vitro* und dessen Factoren. *Arch. f. Exp. Zellforsch.*, T. XI, p. 272.
- et LORENZI (E.), 1928. — Sulla durata dell'intercinesi nelle cellule coltivate *in vitro*. *Rendic. R. Acad. Naz. del Lincei*, 7 ser.; 6, 1^{er} sem., fasc. T. II, p. 936.
- PARKER (R.-C.), 1929. — Physiologische Eigenschaften mesenchymaler Zellen *in vitro*. *Arch. f. Exp. Zellforsch.*, T. VIII, p. 340.
- RIBBERT (H.), 1928. — *Allgemeine Pathologie*, Leipzig.
- WEISS (P.), 1929. — Erzwingung elementarer Strukturverschiedenheiten am *in vitro* wachsenden Gewebe. *Arch. Entw. Mech.*, T. CXVI, p. 438.

PREMIÈRE THÈSE

*Contribution à l'analyse
des premiers stades du développement de l'œuf.
Action de la température.*

VU ET APPROUVÉ :

Paris, le 11 Juillet 1932.

P^r le Doyen de la Faculté des Sciences,

l'Assesseur,

J. PERRIN.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER :

Le Recteur de l'Académie de Paris.

S. CHARLÉTY.

BRODARD & TAUPIN
COULOMMIERS-PARIS
17847-10-32.

